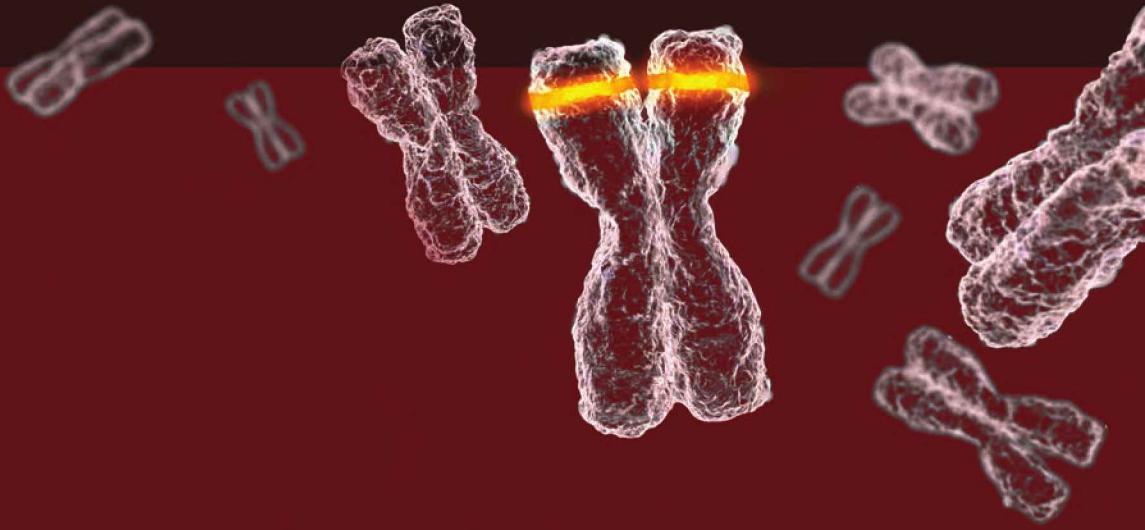


*Sharbel Weidner Maluf*  
*Mariluce Riegel*  
*e colaboradores*



# Citogenética humana





---

C581 Citogenética humana [recurso eletrônico] / Sharbel Weidner  
Maluf... [et al.]. Dados eletrônicos. – Porto Alegre :  
Artmed, 2011.

Editado também como livro impresso em 2011  
ISBN 978-85-363-2509-5

1. Citogenética. I. Maluf, Sharbel Weidner.

CDU 575

---

Catlogação na publicação: Ana Paula M. Magnus – CRB 10/2052

# Citogenética humana

*Sharbel Weidner Maluf*

*Mariluce Riegel*

*e colaboradores*

Versão impressa  
desta obra: 2011



2011

© Artmed Editora S.A., 2011

Capa e projeto gráfico  
*Paola Manica*

Ilustrações  
*Vagner Coelho*

Preparação de originais  
*Ana Rachel Salgado*

Leitura final  
*Luana Janini Peixoto*

Editora sênior – Biociências  
*Leticia Bispo de Lima*

Editora pleno – Biociências  
*Carla Casaril Paludo*

Editoração eletrônica  
*Armazém Digital® Editoração Eletrônica – Roberto Carlos Moreira Vieira*

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à

ARTMED® EDITORA S.A.  
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana  
90040-340 Porto Alegre RS  
Fone (51) 3027-7000 Fax (51) 3027-7070

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

SÃO PAULO  
Av. Embaixador Macedo Soares, 10.735 – Pavilhão 5 – Cond. Espace Center  
Vila Anastácio 05095-035 São Paulo SP  
Fone (11) 3665-1100 Fax (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444

IMPRESSO NO BRASIL  
*PRINTED IN BRAZIL*



## Autores

**Sharbel Weidner Maluf:** Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Coordenador do Laboratório de Citogenética e Citogenética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

**Mariluce Riegel:** Mestre em Genética Humana pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). PhD em Clínica Médica pelo Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Saúde da UFRGS. Pós-doutora em Clínica Médica pelo Instituto de Genética Médica da Universität Zürich. Pesquisadora colaboradora do Serviço de Genética Médica do HCPA. Professora colaboradora do Departamento de Genética da UFRGS. Livre-docente pela Faculdade de Medicina da Universität Zürich.

---

**Albert Schinzel:** MD, PhD, Professor Institute of Medical Genetics Universität Zürich.

**Anna Luiza Vaz Serrão:** Graduada em Biomedicina pela Universidade Severino Sombra-Vassouras. Especialista em Citogenética Humana pelo Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

**Daniela Duarte de Fraga:** Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Especialista em Análises Clínicas pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Pesquisadora na área de Biologia Médica do Laboratório Central do Estado na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB/LACEN-FEPPS).

**Fabiana Michelsen de Andrade:** Mestre e Doutora em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Professora titular dos cursos de Graduação Psicologia e Biomedicina e do Mestrado em Qualidade Ambiental da Universidade Feevale.

**Filippo Pinto Vairo:** Doutorando em Genética pela UFRGS. Médico residente em Genética Médica do HCPA.

**Giorgio Adriano Paskulin:** Especialista em Genética Clínica pela Sociedade Brasileira de Genética Médica (SBGM). Mestre e Doutor em Genética e Biologia Molecular pelo Pro-

grama de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Professor associado da disciplina de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

**Jaqueline Andrades de Miranda:** Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Pesquisadora colaboradora do Laboratório de Biodiversidade Animal da ULBRA.

**José Antônio Magalhães:** Doutor em Medicina pela UNIFESP. Professor associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFRGS. Coordenador do Grupo de Medicina Fetal do HCPA e do Hospital Mãe de Deus.

**Juan Clinton Llerena Junior:** Doutor em Ciências: Citogenética Humana pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). PhD em Ciências Biológicas pela Division of Medical and Molecular Genetics, Guy's Hospital. Médico geneticista da FIOCRUZ. Coordenador do Departamento de Genética Médica da FIOCRUZ. Coordenador do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da FIOCRUZ.

**Júlio César Loguercio Leite:** Doutor em Medicina: Pediatria pela UFRGS. Especialista em Genética Clínica pela SBGM. Pediatra re-

sidente na Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Geneticista clínico residente no HCPA. Coordenador do Programa de Defeitos Congênitos do HCPA/ECLAMC. Professor colaborador do Programa de Pós-graduação em Genética da UFRGS.

**Louise Lapagesse de Camargo Pinto:** Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente pela UFRGS. Professora da Universidade Caxias do Sul (UCS).

**Luciane Bitelo Ludwig:** Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Estagiária do Serviço de Genética Médica do Laboratório de Citogenética do HCPA.

**Luiza Emy Dorfman:** Graduada em Biologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Especialista em Biologia e Genética Forense pela PUCRS.

**Margarete Suñé Mattevi:** Doutora em Ciências pela UFRGS. Professora titular da disciplina de Genética da ULBRA.

**Maria de Lourdes L. F. Chauffaille:** Mestre e Doutora em Hematologia pela UNIFESP. Professora associada e livre-docente da disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP. Responsável pelo Setor de Neoplasias Mieloproliferativas, Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Agudas e pelo Laboratório de Citogenética da Disciplina de Hematologia da UNIFESP.

**Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno:** Graduada em Biomedicina pela UNIFESP. Mestre e Doutora em Biologia Genética pela Universidade de São Paulo (USP). Professora associada e livre-docente da disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP.

**Maria Teresa Vieira Sanseverino:** Especialista em Genética Clínica pela SBGM. Doutora em Pediatria pela UFRGS. Geneticista clínica do Serviço de Genética do HCPA.

**Mariana Saikoski Faller:** Graduada em Biologia pela PUCRS. Mestre em Ciências Médicas pela UFRGS.

**Mariana Severiano Dias:** Graduada em Biomedicina pela UFCSPA. Coordenadora de Postos de Colheitas do Laboratório Central de Análises Clínicas Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA).

**Natália Barcellos:** Graduada em Biomedicina pelo Instituto Porto Alegre (IPA). Pesquisadora do Serviço de Genética Médica do HCPA.

**Pamela Brambilla Bagatini:** Graduada em Biomedicina pela Universidade Feevale. Mestre em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS.

**Paulo Ricardo Gazzola Zen:** Especialista em Genética Médica pela UFCSPA e pela SBGM. Mestre em Genética e Biologia Molecular pelo Programa de Pós-graduação da UFRGS. Doutor em Patologia pelo Programa de Pós-graduação da UFCSPA. Professor adjunto da disciplina de Genética Médica e do Programa de Pós-graduação em Patologia da UFCSPA.

**Rafael Fabiano Machado Rosa:** Especialista em Genética Clínica pela SBGM. Mestre em Patologia pelo Programa de Pós-graduação em Patologia da UFCSPA. Doutorando em Patologia pelo Programa de Pós-graduação em Patologia da UFCSPA. Geneticista clínico do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV).

**Rafaella Mergener:** Graduanda em Biomedicina pela UFCSPA. Estagiária do Serviço de Genética Médica do Laboratório de Citogenética do HCPA.

**Rejane Gus:** Mestre em Genética Humana pela Universidade de Tel Aviv. Doutora em Bioquímica pela UFRGS. Bióloga responsável pelo Laboratório de Diagnóstico Citogenético Pré-Natal do Serviço de Genética Médica do HCPA.

**Roberta Passos Palazzo:** Graduada em Biomedicina pela Universidade Feevale. Mestranda em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-graduação da UFRGS. Pesquisadora do Serviço de Genética Médica do HCPA.

**Saiomara Trento da Silva:** Graduada em Biomedicina pela Universidade Feevale. Bolsista do Serviço de Genética Médica do Laboratório de Citogenética do HCPA.

**Silvia Toledo:** Doutora em Ciências pela UNIFESP. Coordenadora do Laboratório de Genética do Instituto de Oncologia Pediátrica do Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer da UNIFESP (GRAACC/UNIFESP).

**Têmis Maria Félix:** Especialista em Genética Clínica pela SBGM. Doutora em Ciências Médicas: Pediatria pela UFRGS. Médica Geneticista do Serviço de Genética do HCPA.

## Prefácio

Este livro foi elaborado para ser um instrumento didático para estudantes de graduação e pós-graduação. Após alguns anos ministrando a disciplina de Citogenética para a área da saúde, percebemos que, para ter acesso ao conhecimento técnico mais aprofundado, os estudantes precisavam recorrer diretamente a artigos científicos de periódicos internacionais. A inexistência de uma obra didática e ao mesmo tempo aprofundada sobre o tema nos impulsionou nesse desafio de abordar a citogenética humana da maneira mais completa possível.

Entre as preocupações dos autores desta obra, estava a obrigatoriedade da realização de revisões bibliográficas para que o leitor tenha acesso, em cada tema abordado, aos artigos recentemente publicados na área.

O livro inicia com um breve histórico e parte para a citogenética básica, desde a estrutu-

ra normal do cromossomo humano, passando pelos mecanismos de divisão celular e seu controle (bases importantes para quem pretende entender o câncer) até os cariótipos alterados, sempre comentando as últimas descobertas publicadas na literatura. A partir dessa base, são abordadas as diversas áreas da citogenética: a epigenética, as técnicas de mutagênese e o diagnóstico citogenético do câncer.

A citogenética molecular, com suas aplicações – inclusive no diagnóstico pré-natal, pré-implantacional e nas síndromes de microdeleções – também é amplamente abordada. Para finalizar, contamos com um primoroso capítulo do professor Albert Schinzel, que nos brinda com sua experiência no diagnóstico clínico das cromossomopatias.

**Os autores**

# Sumário

- 1** História da citogenética clínica ..... 11  
Margarete Suñé Mattevi,  
Jaqueline Andrades de Miranda
- 2** Estrutura do cromossomo humano e organização molecular da cromatina ..... 17  
Natália Barcellos, Saiomara Trento,  
Sharbel Weidner Maluf
- 3** Ciclo celular..... 24  
Mariana Severiano Dias,  
Sharbel Weidner Maluf
- 4** Controle do ciclo celular ..... 43  
Mariana Severiano Dias,  
Sharbel Weidner Maluf
- 5** Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética ..... 54  
Rejane Gus
- 6** Técnicas de bandeamento e coloração cromossômica..... 63  
Jaqueline Andrades de Miranda,  
Margarete Suñé Mattevi
- 7** Alterações cromossômicas numéricas..... 70  
Daniela Duarte de Fraga,  
Filippo Pinto Vairo, Sharbel Weidner Maluf
- 8** Alterações cromossômicas estruturais ..... 80  
Rafaella Mergener, Luciane Bitelo Ludwig,  
Sharbel Weidner Maluf
- 9** Alterações dos cromossomos sexuais ..... 103  
Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno
- 10** Mecanismo de inativação do cromossomo X e alterações cromossômicas..... 119  
Louise Lapagesse de Camargo Pinto,  
Sharbel Weidner Maluf
- 11** *Imprinting* e dissomia uniparental ..... 127  
Fabiana Michelsen de Andrade
- 12** Sítios frágeis..... 147  
Têmis Maria Félix
- 13** Síndromes de instabilidade cromossômica: anemia de Fanconi..... 151  
Juan Clinton Llerena Junior,  
Anna Luiza Vaz Serrão
- 14** Origem, causas e mecanismos de formação das alterações cromossômicas..... 162  
Sharbel Weidner Maluf
- 15** Técnica de aberrações cromossômicas para avaliação do dano de DNA..... 169  
Roberta Passos Palazzo,  
Sharbel Weidner Maluf
- 16** Troca entre cromátides-irmãs... 176  
Pamela Brambilla Bagatini,  
Sharbel Weidner Maluf
- 17** Técnica micronúcleos com bloqueio da citocinese celular..... 180  
Roberta Passos Palazzo,  
Sharbel Weidner Maluf

<b>18</b>	Ensaio cometa .....	194	<b>26</b>	Citogenética de tumores sólidos .....	252
	Pamela Brambilla Bagatini, Sharbel Weidner Maluf			Silvia Toledo	
<b>19</b>	Diagnóstico citogenético da leucemia mieloide crônica.....	203	<b>27</b>	Síndromes de microdeleção cromossômica.....	258
	Maria de Lourdes L. F. Chauffaille			Têmis Maria Félix, Filippo Pinto Vairo, Júlio César Loguercio Leite	
<b>20</b>	Diagnóstico citogenético da leucemia mieloide aguda .....	208	<b>28</b>	Citogenética molecular .....	264
	Maria de Lourdes L. F. Chauffaille			Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno, Mariluce Riegel	
<b>21</b>	Diagnóstico citogenético da síndrome mielodisplásica.....	213	<b>29</b>	Hibridização genômica comparativa em microarranjos ou <i>array</i> -CGH .....	273
	Maria de Lourdes L. F. Chauffaille			Mariluce Riegel	
<b>22</b>	Diagnóstico citogenético das síndromes mieloproliferativas crônicas.....	219	<b>30</b>	Diagnóstico pré-natal das anomalias citogenéticas.....	280
	Maria de Lourdes L. F. Chauffaille			Rejane Gus, Maria Teresa Vieira Sanseverino, José Antônio Magalhães	
<b>23</b>	Diagnóstico citogenético da leucemia linfocítica aguda .....	223	<b>31</b>	Alterações citogenéticas na infertilidade e nos abortamentos de repetição .....	286
	Paulo Ricardo Gazzola Zen, Giorgio Adriano Paskulin, Rafael Fabiano Machado Rosa			Maria Teresa Vieira Sanseverino, Luiza Emy Dorfman	
<b>24</b>	Diagnóstico citogenético da leucemia linfocítica crônica .....	234	<b>32</b>	Diagnóstico genético pré-implantação .....	294
	Giorgio Adriano Paskulin, Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazzola Zen			Mariana Saikoski Faller	
<b>25</b>	Diagnóstico citogenético dos linfomas malignos .....	242	<b>33</b>	Achados clínicos em pacientes com aberrações cromossômicas autossômicas .....	317
	Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazzola Zen, Giorgio Adriano Paskulin			Albert Schinzel	
				Índice.....	327

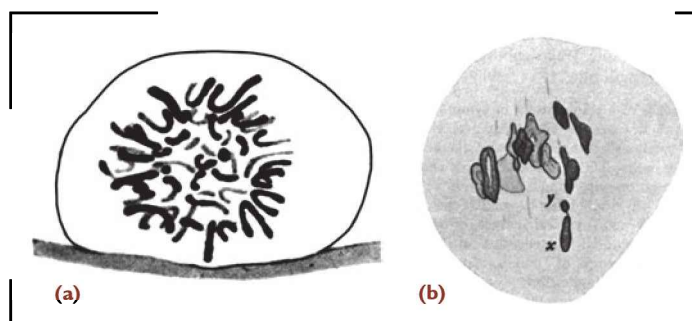
Margarete Suñé Mattevi  
Jaqueline Andrades de Miranda

## História da citogenética clínica

O início da citogenética humana é geralmente atribuído a Walther Flemming, um citologista e professor de anatomia austríaco que, em 1882, publicou as primeiras ilustrações dos cromossomos humanos. Flemming também se referiu à porção corável do núcleo como *cromatina*, além de ter sido o primeiro a utilizar o termo *mitose*. Em 1888, Waldeyer introduziu a palavra *cromossomo*, a partir das palavras gregas para “corpo colorido”, e vários cientistas proeminentes da época começaram a formular a ideia de que os determinantes da hereditariedade são transportados pelos cromossomos. Após a “redescoberta” da herança mendeliana, em 1900, Sutton (e na mesma época, de forma independente, Boveri) desenvolveu formalmente a chamada *Teoria Cromossômica da Herança*. Sutton combinou as disciplinas de Citologia e Genética quando denominou o estudo dos cromossomos como *Citogenética*.

Em parte devido a melhorias nas lentes ópticas, no final do século 19 e início do século 20, o estudo da citogenética continuou, com ênfase especial, por parte de alguns citologistas,

na determinação do número correto de cromossomos, assim como em qual seria a configuração sexual dos seres humanos. Surgiram vários relatos, com diferentes estimativas. Por exemplo, em 1912, von Winiwarter concluiu que os homens têm 47 cromossomos e as mulheres 48, propondo para a nossa espécie um mecanismo de determinação do sexo do tipo XX/Xo. Em seguida, Painter<sup>1</sup> estudou cromossomos meióticos derivados dos testículos de vários prisioneiros enforcados no estado do Texas (**Figura 1.1**). Painter<sup>1</sup> relatou o número diploide humano como sendo definitivamente 48 (o dobro dos 24 bivalentes que observou), embora, dois anos antes, ele houvesse preliminarmente referido que algumas de suas melhores amostras mostravam um número diploide de 46. No mesmo estudo, o autor também propôs que nos seres humanos os cromossomos sexuais seriam o X e o Y. Um ano mais tarde, Levitsky<sup>2</sup> sugeriu o termo *cariótipo* para descrever o arranjo ordenado de cromossomos. Com a passagem do tempo, apesar das melhorias técnicas, houve claramente algumas dificuldades em visuali-



**Figura 1.1**

Desenhos dos trabalhos originais de (a) von Winiwarter, mostrando uma mitose espermatogonial, e de (b) Painter<sup>1</sup>, mostrando o bivalente sexual na primeira anáfase da meiose.

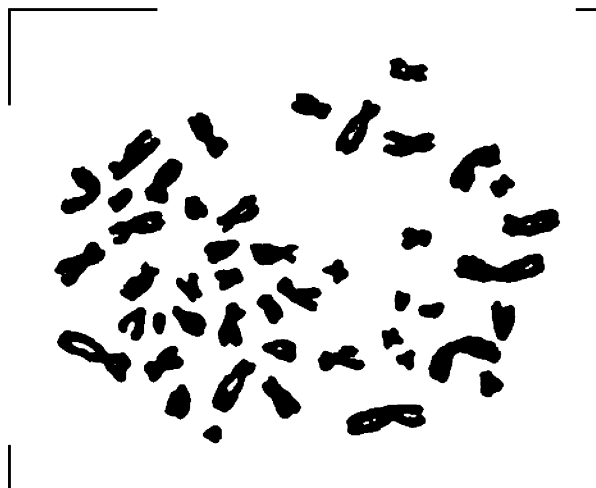
zar ou discriminar corretamente os cromossomos humanos, e o número diploide de 48 de Painter<sup>1</sup> foi “confirmado” por diversas vezes ao longo das décadas seguintes.

Em 1952, Hsu,<sup>3</sup> por exemplo, notificou que a análise dos cromossomos poderia ser facilitada ao se estudar células cultivadas em vez de células obtidas a partir de cortes histológicos. O autor, a seguir, demonstrou a utilidade deste método (cultivo de tecidos) ao empregá-lo na análise de culturas de células embrionárias humanas, a partir da qual foi construído assim um ideograma de todos os 48 cromossomos humanos de metáfases mitóticas.

Assim como em outras importantes descobertas, a correção desta imprecisão científica deu-se graças a um evento não planejado – um erro de laboratório! Sua origem pode ser encontrada no adendo que aparece no final de um artigo de Hsu:<sup>3</sup> “verificou-se, após este artigo ter sido enviado à publicação, que as metáfases melhor espalhadas resultaram de um acidente. Antes da fixação, em vez de serem lavadas com uma solução salina isotônica, as culturas foram lavadas em uma solução hipotônica” (no caso da solução hipotônica, a água entra nas células por osmose, ocasionando o aumento das membranas celulares e separando os cromossomos, tornando mais fácil sua visualização). Este acidente foi a chave que desbloqueou o futuro da citogenética humana. Dentro de um ano, Hsu e Pomerat,<sup>4</sup> percebendo o potencial deste evento fortuito, relataram um procedimento de “choque hipotônico”. Em 1955, Ford e Hamerton<sup>5</sup> tinham modificado

essa técnica e também tinham trabalhado em um método de pré-tratamento das células cultivadas com colchicina, de forma a bloquear o fuso mitótico e, assim, acumular células em metáfase. Joe Hin Tjio, um americano nascido na Indonésia, fez um estágio no laboratório de Ford e Hamerton para aperfeiçoar ainda mais estas técnicas. Em novembro de 1955, foi convidado por Tjio em Lund, Suécia, a trabalhar no laboratório de seu colega, Levan, um espanhol que tinha aprendido os métodos de colchicina e de solução hipotônica no laboratório de Hsu (no Instituto Sloan-Kettering, em Nova York) com culturas de fibroblastos de pulmão de embriões humanos.

Tjio e Levan<sup>6</sup> otimizaram o método de colchicina/hipotônica para estas células e, em janeiro de 1956 (após cuidadosa revisão das imagens de décadas de trabalhos apresentados anteriormente), relataram, diplomaticamente, que o número diploide humano parecia ser 46, não 48 (**Figura 1.2**). Tjio e Levan<sup>6</sup> concluíram seu artigo declarando o seguinte: “não queremos generalizar nossos achados, mas informamos que o número cromossômico do homem é  $2n=46$ , pois é difícil evitar concluir que essa seria a explicação mais natural para as nossas observações”. Logo a seguir, Ford e Hamerton<sup>7</sup> confirmaram a constatação de Tjio e Levan,<sup>6</sup> e o que foi um dogma por mais de 30 anos foi derrubado pelo que se tornou um artigo clássico da literatura científica. Inicia-se, então, a era da citogenética clínica quando, três anos depois, são identificadas quatro síndromes cromossômicas.



**Figura 1.2**

Metáfase obtida com o uso de colchicina a partir de fibroblastos de pulmão embrionário humano, cultivados *in vitro*, do trabalho original de Tjio e Levan<sup>6</sup>.

O conceito de que uma anormalidade envolvendo os cromossomos poderia ter um efeito fenotípico não era original. Em 1932, Waardenburg sugeriu de que a síndrome de Down talvez pudesse ser o resultado de uma aberração cromossômica, mas a ciência da época não podia nem provar nem refutar esta ideia, o que iria demorar quase três décadas. Em 1958, Lejeune, estudando os cromossomos de fibroblastos em cultura de pacientes com síndrome de Down (e, em 1959, Lejeune e colaboradores), descreveu um cromossomo extra em suas células. Foi relatada uma trissomia envolvendo um dos menores pares de cromossomos, que acabaria sendo referida como trissomia 21.<sup>8</sup>

Em 1959, também foram descritas mais três síndromes cromossômicas, todas envolvendo os cromossomos sexuais. Ford e colaboradores<sup>9</sup> relataram que mulheres com a síndrome de Turner têm 45 cromossomos, aparentemente com um único cromossomo X e não o Y; Jacobs e Strong<sup>10</sup> demonstraram que homens com a síndrome de Klinefelter apresentam 47 cromossomos, com o acréscimo de um cromossomo pertencente ao grupo que contém o cromossomo X. Também foi demonstrado por Patrícia Jacobs que uma mulher com disfunção sexual é portadora de 47 cromossomos com um complemento sexual XXX.

O sexo cromossômico apresentado por essas síndromes contribuiu para explicar um fenômeno que havia sido observado dez anos antes. Em 1949, Barr e Bertram,<sup>11</sup> estudando células neurais de gato, observaram um pequeno corpúsculo corado na periferia da interfase de alguns núcleos. Seus registros foram suficientemente detalhados para eles aperceberem-se que isso ocorria apenas nos núcleos dos gatos do sexo feminino. Esse elemento, por eles designado de cromatina sexual (agora conhecida como cromatina do X ou corpúsculo de Barr), corresponde, na verdade, ao cromossomo X inativado, presente em células nucleadas de todos os mamíferos do sexo feminino normais, mas ausente em machos normais. A constatação de que nas síndromes de Turner e de Klinefelter e nas pacientes XXX ocorrem respectivamente 0, 1 e 2 corpúsculos de Barr esclareceu o mecanismo de determinação do sexo em seres humanos, confirmando, pela primeira vez, que

é a presença ou a ausência do cromossomo Y que determina masculinização, e não apenas o número de cromossomos X presentes, como em *Drosophila*. Em 1961, foi desenvolvido por Mary Lyon<sup>12</sup> um mecanismo de compensação de dose em mamíferos com base em um único cromossomo X ativo, o que, desde então, tem sido conhecido como a hipótese de Lyon.

Não demorou muito tempo depois do relato de Lejeune e colaboradores<sup>8</sup> da base cromossômica da síndrome de Down para que outras anormalidades autossômicas fossem descobertas. Em 1960, Patau e colaboradores<sup>13</sup> descreveram duas crianças com um cromossomo semelhante extra no “grupo D”. Logo a seguir, Edwards e colaboradores<sup>14</sup> apresentaram “uma nova síndrome trissômica” em um bebê e em uma garota com uma constelação de anormalidades fenotípicas e portadores de outra trissomia autossômica. A primeira ficou conhecida como síndrome de Patau ou “trissomia D”, e a segunda, como síndrome de Edwards ou “trissomia E” (trissomias 13 e 18, respectivamente).

Também em 1960, Nowell e Hungerford<sup>15</sup> relataram a presença do “cromossomo Filadélfia”, na leucemia mieloide crônica, evidenciando, pela primeira vez, uma associação entre cromossomos e câncer. Em 1963 e 1964, Lejeune e colaboradores<sup>16,17</sup> relatam que três recém-nascidos (RNs) com a síndrome do choro do “miado do gato” (*cri du chat*) e outras anomalias fenotípicas portavam uma deleção do braço curto de um cromossomo do “grupo B”, designado como cromossomo 5. No espaço de dois anos, Jacobs e colaboradores<sup>18</sup> descreveram “um comportamento agressivo, com uma subnormalidade mental em um homem XYY”. Neste período, também foram relatadas instabilidades cromossômicas associadas à síndrome de Bloom e à anemia de Fanconi. Já outros avanços técnicos anteriores haviam facilitado a rotina do estudo dos cariótipos de pacientes. Assim, em 1960, Nowell<sup>19</sup> observou que a fitoemaglutinina (presente no extrato do feijão roxo), utilizada para separar as hemácias dos leucócitos, estimulava a divisão dos linfócitos. Esta descoberta aboliu a necessidade de se realizar aspirados da medula óssea, considerada, anteriormente, a melhor metodologia para a obtenção de um número suficiente de células que entram em divisão espontaneamente. Assim, passou a ser possí-



vel obter-se células mitóticas adequadas para a análise de cromossomos de quase qualquer pessoa.

Contudo, passados nove anos da descoberta do número de cromossomos em seres humanos, somente três trissomias autosômicas, quatro aneuploidias sexuais, uma anormalidade estrutural (uma deleção), uma anormalidade cromossômica adquirida e associada ao câncer e dois distúrbios de quebra cromossômica haviam sido descritos como “síndromes cromossômicas” reconhecíveis. Uma nova disciplina laboratorial clínica havia nascido. Estaria ela destinada unicamente ao diagnóstico de algumas poucas anormalidades? Na época, este parecia ser o cenário mais provável. Ainda que certos pares fossem distinguíveis pelo tamanho e pela posição do centrômero, os cromossomos não podiam ser identificados individualmente e, como resultado, as anormalidades específicas de um paciente podiam ser observadas, mas não caracterizadas. Além disso, a existência de certas anormalidades, como inversões envolvendo um único braço do cromossomo (as chamadas inversões *paracêntricas*), abria a possibilidade de formular hipóteses, mas não trazia consigo qualquer prova, pois estas anomalias não eram visualizáveis. De fato, parecia que, sem um método que permitisse a identificação definitiva de cada cromossomo (e, o mais importante, das regiões de cada cromossomo), este novo campo da medicina teria seu escopo limitado ao estudo de alguns poucos distúrbios. Durante certo tempo, a citogenética permaneceu relegada a este destino.

Foi quando, em 1968, Torbjörn Caspersson observou que, sempre que os cromossomos vegetais eram corados com compostos fluorescentes derivados da quinacrina, a fluorescência que mostravam não era uniforme: ao contrário, uma série de bandas cintilantes e opacas era observada ao longo de todo o comprimento do cromossomo. Ademais, cada par fluorecia de acordo com um padrão diferente, de forma que cromossomos anteriormente indistinguíveis podiam agora ser reconhecidos. Caspersson e colaboradores,<sup>20-22</sup> então, voltaram suas atenções do estudo dos cromossomos vegetais para a investigação dos cromossomos humanos. Os autores formularam a hipótese de que um derivado da quinacrina, a quinacrina mostarda (QM), ligava-se prefe-

rencialmente aos resíduos de guanina, e que as regiões ricas em guanina e citosina (GC) dos cromossomos deveriam, portanto, gerar “bandas” mais brilhantes — tal como inicialmente as chamaram — enquanto as regiões ricas em adenina e timina (AT) teriam aparência opaca. Apesar de ter sido provado posteriormente que são as regiões ricas em AT que apresentam marcante fluorescência e que o diidrocloreto de quinacrina funciona tão bem quanto a própria QM, em 1971, Caspersson e colaboradores<sup>20</sup> conseguiram produzir um único padrão de bandeamento para cada par de cromossomos humanos. Pela primeira vez, cada cromossomo humano pôde ser identificado em definitivo.

Entretanto, o método era trabalhoso, exigindo um microscópio de fluorescência relativamente caro e um ambiente que pudesse ser escurecido. Além disso, a fluorescência normalmente esvaecia-se ou apagava-se depois de poucos minutos, o que dificultava a análise microscópica em tempo real. Estes obstáculos foram vencidos um ano mais tarde, quando o uruguaio Eduardo Drets e a norte-americana Margareth Shaw<sup>23</sup> descreveram um método para a produção de padrões de bandeamento cromossômico semelhantes utilizando um pré-tratamento com álcali e solução fisiológica e coloração com Giemsa (um composto desenvolvido para a identificação do protozoário causador da malária em esfregaços de sangue). Não obstante o fato de algumas das designações de cromossomos propostas por Drets e Shaw<sup>23</sup> terem sido alteradas (sobretudo em favor daquelas propostas por Caspersson), o método — e as diversas variantes que se seguiram — facilitou a ampla utilização de técnicas citogenéticas na clínica médica. Apesar de a disponibilidade de indivíduos com o treinamento e a experiência adequados limitar o número e a capacidade dos laboratórios capazes de executar estes procedimentos (dificuldade que persiste no presente, em alguns casos), a tecnologia propriamente dita estava ao alcance de qualquer instituição. Seguiu-se a isso a definição de uma gama de anormalidades e síndromes cromossômicas: aneuploidias, deleções, microdeleções, translocações, inversões (incluindo a paracêntrica), inserções e mosaicos, além de uma crescente coleção de rearranjos e outras anomalias citogenéticas associadas a neoplasias e um número aparen-

temente infinito de rearranjos específicos a um paciente ou a uma família.

Graças à aplicação destas tecnologias, viabilizando a identificação de regiões cada vez menores do cariótipo, genes e cromossomos passaram a ser mapeados a uma velocidade estonteante. Abriu-se o caminho para o surgimento da *citogenética molecular*, uma disciplina que utiliza as técnicas de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Nos últimos anos, o desenvolvimento da FISH e de muitas outras técnicas dela derivadas despertou um interesse ainda maior no cariótipo humano. Com isso, chegamos ao momento presente. Mais de um milhão de análises citogenéticas e citogenéticas moleculares são realizadas a cada ano, em mais de 400 laboratórios em

todo o mundo. Gestantes acima de 35 anos de idade ou aquelas que apresentam resultados desviantes de *screening* genético rotineiramente passam por testes citogenéticos, e muitas na verdade também fazem análises de ploidia via FISH, como parte da rotina pré-natal. No caso de crianças com distúrbios fenotípicos e/ou mentais e de casais que sofrem com problemas de reprodução, a citogenética ganhou lugar no quotidiano das investigações clínicas, e a FISH possibilita visualizar alterações sutis demais para serem detectadas por meio da análise cromossômica clássica. A citogenética tradicional e a FISH em particular disponibilizam, também, informações vitais ao diagnóstico, prognóstico, tratamento e monitoramento de uma diversidade de cânceres.

## Referências

1. Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool.* 1923 Apr;37(3):291-336.
2. Levitsky GA. The material basis of heredity. Kiev: State Publication Office of the Ukraine; 1924.
3. Hsu TC. Mammalian chromosomes in vitro: I. The karyotype of man. *J Hered.* 1952 Jul;43(4):167-72.
4. Hsu TC, Pomerat CM. Mammalian chromosomes in vitro: II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J Hered.* 1953 Jan;44(1):23-9.
5. Ford CE, Hamerton JL. The chromosomes of man. *Nature.* 1956 Nov 10;178(4541):1020-3.
6. Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man. *Hereditas.* 1956 May;42(1-2):1-6.
7. Ford CE, Hamerton JL. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956 Nov;31(6):247-51.
8. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959 Mar 16;248(11):1721-2.
9. Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1959 Apr 4;1(7075):711-3.
10. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 1959 Jan 31;183(4657):302-3.
11. Barr ML, Bertram LF. A morphological distinction between neurones of the male and the female and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature.* 1949 Apr 30;163(4148):676-7.
12. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature.* 1961 Apr 22;190:372-3.
13. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL. Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet.* 1960 Apr 9;1(7128):790-3.
14. Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome. *Lancet.* 1960 Apr 9;1(7128):787-90.
15. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960 Nov 18;132(3438):1497.
16. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, et al. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1963 Nov 18;257:3098-102.
17. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Turpin R. Familial segregation of a 5-13 translocation determining partial monosomy and a trisomy of the short arm of the 5 chromosome: "cat cry" disease and its "receptical". *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1964 Jun 8;258:5767-70.
18. Jacobs PA, Brunton M, Melville MM, Brittain RP, McClellmont WF. Aggressive behavior, mental sub-normality and the XYY male. *Nature.* 1965 Dec 25;208(5017):1351-2.
19. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 1960 May;20:462-6.
20. Caspersson T, Castleman KR, Lomakka G, Modest EJ, Moller A, Nathan R, et al. *Exp Cell Res.* 1971 Jul;67(1):233-5.
21. Caspersson T, Lomakka G, Zech L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase

- chromosomes - distinguishing characters and variability. *Hereditas*. 1972;67(1):89-102.
22. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 1970 Jun;60(3):315-9.
  23. Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns in human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Sep;68(9):2073-7.

---

## Leituras recomendadas

Fisher A. *Biology of tissue cells*. Cambridge: Cambridge University Press; 1946.

German J, Archibald R, Bloom D. Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man. *Science*. 1965 Apr 23;148:506-7.

Hsu TC. *Human and mammalian cytogenetics: an historical perspective*. New York: Springer-Verlag; 1979.

Jacobs PA, Baikie AG, Brown WM, Macgregor TN, Maclean N, Harnden DG. Evidence for the existence of the human "super female". *Lancet*. 1959 Sep 26;2(7100):423-5.

Jacobs PA, Brunton M, Melville MM, Brittain RP, McClemon WF. Aggressive behavior, mental subnormality and the XYY male. *Nature*. 1965 Dec 25;208(5017):1351-2.

Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature*. 1961 Apr 22;190:372-3.

Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool*. 1923 Apr;37(3):291-336.

Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL. Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet*. 1960 Apr 9;1(7128):790-3.

Natália Barcellos  
Saionara Trento  
Sharbel Weidner Maluf

# Estrutura do cromossomo humano e organização molecular da cromatina

## Estrutura básica do DNA

O DNA é um longo polímero de fitas duplas e antiparalelas, em forma de hélice, formado por três componentes básicos: um açúcar (pentose – desoxirribose), um grupo fosfato e dois tipos de bases nitrogenadas – as pirimidinas (citosina e timina) e as purinas (adenina e guanina), representadas pelas letras C, T e A, G, respectivamente. Um açúcar ligado a uma base constitui um nucleosídeo. Quando o nucleosídeo contém um grupo fosfato ligado ao carbono 5' ou 3', em uma ligação fosfodiéster, forma-se um nucleotídeo, que é a unidade fundamental de repetição do DNA.

As fitas de DNA são unidas por pontes de hidrogênio que ocorrem entre essas bases lateralmente opostas, formando os pares de bases (pb) através das seguintes ligações específicas: a adenina (A) liga-se com a timina (T) e a citosina (C) com a guanina (G). Por essa razão, a quantidade de A é a mesma de T e a quantidade de C é a mesma de G. A informação genética está codificada nessa sequência linear de bases, e o fato de as fitas serem complementares torna possível, entre outros fatores, a replicação da molécula a cada ciclo celular.

## Condensação do DNA

As células humanas têm núcleos de, em média, 10  $\mu$  de diâmetro, e contêm mais de

dois metros de DNA embalados em 46 cromossomos. Pelo fato de o genoma ocupar um espaço tão limitado, uma célula deve duplicar uniformemente todo seu DNA antes de se dividir. A fim de realizar esta tarefa, as unidades de cromatina se tornam muito compactas e maleáveis. Esse processo ainda não está totalmente esclarecido devido a sua grande complexidade, tanto estrutural quanto molecular.

O genoma humano é constituído por aproximadamente  $3,2 \times 10^9$  nucleotídeos que estão compactados e distribuídos nos 24 cromossomos (22 autossômicos e 2 sexuais). Cada cromossomo é composto por uma única fita de DNA contínua (entre 50 milhões e 250 milhões de pares de bases) associada a diversas proteínas histônicas e proteínas não histônicas ácidas: esse complexo é chamado de cromatina. Essas proteínas são a base de toda a arquitetura do DNA condensado. Além de DNA e proteínas, o RNA também faz parte da constituição da cromatina.

As histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) desempenham uma importante função na condensação da cromatina, estando presentes em grandes quantidades – cerca de 60 milhões de tipos de moléculas em cada célula. Elas são proteínas pequenas de pH básico acentuado (alta proporção dos aminoácidos lisina e arginina) e que facilitam a interação com o DNA.

A fita de cromatina é condensada primeiramente em nucleossomos – estrutura proposta por Kornberg e Thomas em 1974.<sup>1</sup> O nucleossomo é a unidade fundamental de empacota-

mento da cromatina, com 11 nm de diâmetro, e é um complexo composto de oito proteínas histônicas (octâmero de histonas), organizado em um tetrâmero  $(H_3)^2(H_4)^2$  e em dois dímeros  $H_2A-H_2B$ .<sup>2</sup>

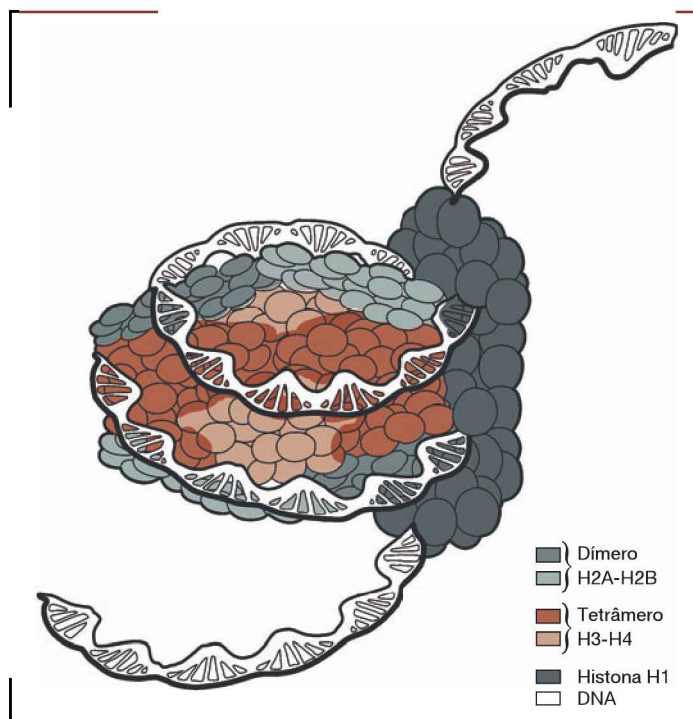
Neste octâmero de histonas, o tetrâmero se configura em uma posição centralizada e estão localizados os dois dímeros. Em torno deste octâmero, um segmento de DNA se enrola e fica fixo em aproximadamente 1,75 volta, contendo em torno de 146 a 147 pares de nucleotídeos.<sup>3,4</sup> A histona H1 se encontra ligada nessa região, fazendo a interação entre o octâmero e o DNA, estabilizando o nucleossomo (**Figura 2.1**). A H1 contribui diretamente na compactação longitudinal dos cromossomos e na expressão gênica. A quantidade de H1 por nucleossomo parece ser muito variável. Uma H1 por nucleossomo pode ser considerada mais como uma exceção do que uma regra, diferente do que se pensava anteriormente.<sup>5</sup>

Neste primeiro nível de compactação, o DNA já reduz sua extensão em um terço da original. Esta conformidade descrita é vista *in vivo* somente em determinadas regiões, onde histonas H1 específicas são removidas.

Normalmente, a cromatina se encontra sempre em níveis mais elevados de condensação (mesmo na interfase), com um diâmetro de aproximadamente 30 nm. Intercalando cada nucleossomo, existe um DNA de ligação (*linker DNA*), podendo conter de 0 a 80 pb.

A próxima etapa de compactação da cromatina é explicada por várias teorias, pois ainda não está bem esclarecido se o formato do *linker DNA* é reto ou segue uma curvatura, sendo o mais aceito, de acordo com alguns estudos,<sup>6</sup> o *modelo em ziguezague*. Neste nível de compactação, a cromatina chega a um diâmetro de 30 nm, sendo que os nucleossomos localizam-se na parte mais externa da fibra, e o papel da histona H1 é imprescindível para a arquitetura e a estabilidade desta estrutura. A parte N-terminal da histona H3 também parece participar da sua integridade, contribuindo para a aproximação dos nucleossomos adjacentes ou modificando a conformação do DNA de ligação.

Ainda é pouco elucidada a etapa de condensação que segue a de 30 nm em nível molecular, mas sabe-se que existe uma organização em alças de 100 kb, que saem de um



**Figura 2.1**

Esquema tridimensional de um nucleossomo.

eixo central envolvendo uma matriz proteica. Acredita-se que é muito importante a participação das proteínas não histônicas neste complexo processo, pois elas interagem com os nucleossomos e com o DNA de ligação, contribuindo para a formação dessa nova estrutura da cromatina, juntamente com a histona H3, cuja fosforilação tem função de condensar os cromossomos de forma padronizada na mitose e na meiose (**Figura 2.2**).

A condensação máxima da cromatina ocorre durante a divisão celular (ver Capítulo 2.3), mais especificamente na metáfase, etapa na qual os cromossomos encontram-se 10.000 vezes mais curtos do que na forma de DNA estendido, sendo que grande parte do genoma encontra-se inativada. No entanto, não é claro se a desativação da cromatina se deve a uma atividade enzimática e/ou a um bloqueio que dificulta o acesso dos fatores de transcrição, ou da máquina de remodelação da cromatina.<sup>7</sup>

## Centrômero (constricção primária)

Centrômeros são regiões cromossômicas que têm a habilidade de mediar a ligação dos microtúbulos ao DNA, através de uma estrutura proteica conhecida como cinetócoro. A região centromérica contém um núcleo central para a montagem do cinetócoro durante a divisão celular. Esse complexo vai garantir uma distribuição igual de cromossomos para as

células-filhas.<sup>8</sup> O DNA nesta região é formado por sequências altamente repetitivas, que originam uma constricção no cromossomo chamada de constricção primária. Neste sítio, unem-se as cromátides-irmãs, sendo também o local onde ocorre a formação do cinetócoro.<sup>9</sup>

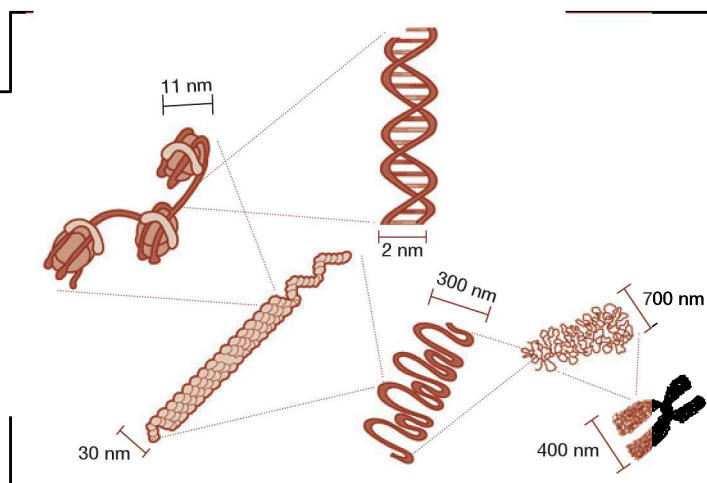
O cinetócoro é uma estrutura única que liga os cromossomos ao fuso acromático, monitora essa ligação de cada cromossomo, através do *checkpoint* mitótico (ver Capítulo 4), e une as forças do fuso acromático e das proteínas para mover os cromossomos durante a prometáfase e a anáfase (**Figura 2.3**).

O segmento cromossômico situado acima do centrômero é chamado de braço curto (p – do francês, *petit*), e abaixo do centrômero fica o braço longo (q). Assim, os cromossomos são classificados em três tipos, conforme a posição do centrômero: metacêntrico, quando o centrômero se localiza aproximadamente na região central e divide o cromossomo em dois braços de tamanhos similares; submetacêntrico, com o centrômero fora da região central e braços ligeiramente desiguais; acrocêntrico, com o centrômero próximo da extremidade e um braço curto muito pequeno. Em outras espécies, existe ainda um quarto tipo, o telocêntrico, no qual o centrômero está na extremidade e, por isso, o cromossomo não apresenta braço curto.

Em metáfases de cromossomos humanos tratados com colchicina, o centrômero é visto nitidamente em todos os cromossomos. Durante a interfase, os centrômeros são vistos com coloração DAPI como estruturas brilha-

**Figura 2.2**

Os vários níveis de condensação da cromatina, da fita de DNA ao cromossomo metafásico.



tes no núcleo, indicando a presença de um constituinte de cromatina condensada.<sup>10</sup>

## Constrições secundárias

Em humanos, esse tipo de constrição é observado nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos. Em consequência deste estreitamento, sua extremidade apresenta-se visualmente separada do restante do cromossomo, sendo por isso denominada satélite (porção de cromatina que se localiza distal à constrição secundária dos acrocêntricos humanos) (**Figura 2.4**). Essa constrição frequentemente é vista, durante a prófase, associada ao nucléolo, razão pela qual é denominada também região organizadora de nucléolos (RON). Essa associação deve-se ao fato de que, nas constrições secundárias, situam-se os genes que produzem subunidades de RNA ribossomais.

## Telômeros

As extremidades dos cromossomos possuem uma sequência de DNA (TTAGGG) repetida muitas vezes (a extensão dos telômeros varia de 3 a 20 kb). Essa região está associada a proteínas que evitam que os cromossomos se juntem uns aos outros, pois cromossomos quebrados tendem a se fundir.<sup>11</sup> Estas repetições, em grande parte, servem como locais para vinculação de proteínas específicas dos telômeros que impedem de obter o reparo das respostas normalmente ativadas por sequências de DNA terminais.

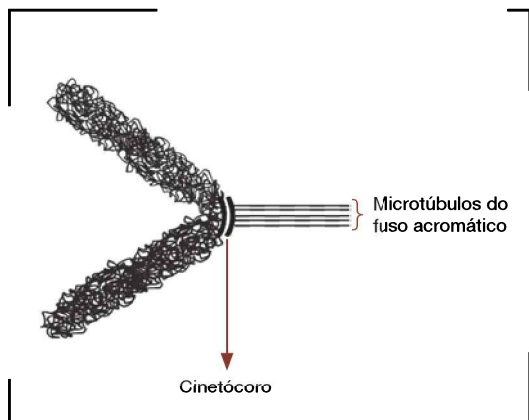
Estas estruturas estão envolvidas em diversas funções biológicas essenciais, entre as quais pode-se mencionar:

- proteger os cromossomos de recombinações e fusões das sequências finais com outros cromossomos;
- reconhecer danificações no DNA;
- estabelecer mecanismos para replicações dos cromossomos;
- contribuir na organização funcional cromossômica no interior do núcleo;
- participar na regulação da expressão gênica, e
- servir à maquinaria molecular como um “relógio” que controla a capacidade replicativa de células humanas e a entrada destas em senescência celular.<sup>12</sup>

O tamanho dos telômeros é mantido por enzimas, chamadas de telomerasas, que adicionam as repetições de seis nucleotídeos à sua extremidade.<sup>13</sup>

## Telomerase

O DNA é duplicado com o auxílio da enzima DNA-ligase, de forma semiconservativa, tendo cada nova molécula-filha de DNA uma fita oriunda da molécula-mãe e uma fita recém-sintetizada. A DNA-polimerase é eficaz em grande parte do cromossomo, porém é totalmente inútil no final dos terminais teloméricos devido à impossibilidade de



**Figura 2.3**

**Cromátide ou cromossomo-filho na anáfase migrando para um dos polos para formar a célula-filha.**

ação da ligase por total falta de sítio para o seu anelamento à sequência-mãe, gerando o encurtamento dos telômeros. É no ponto de impossibilidade de ação do complexo DNA-polimerase/RNA-polimerase/helicase/ligase que a telomerase atua, impedindo o encurtamento telomérico.<sup>14</sup>

A enzima telomerase utiliza um componente interno, e também desempenha um papel importante, pois impede que as sequências teloméricas terminais se percam a cada divisão celular. No entanto, essa enzima só está ativa nas células germinativas e embrionárias. Logo, à medida que se multiplicam, as células somáticas sofrem um encurtamento de suas extremidades, devido a uma falta de atividade da telomerase.<sup>15</sup> Talvez esse encurtamento funcione como um sinalizador para os mecanismos de apoptose, indicando que a célula está envelhecendo e apresenta maior possibilidade de sofrer uma alteração estrutural.

O funcionamento dos telômeros é crucial para o crescimento celular e a estabilidade do cromossomo. A maioria das células somáticas humanas tem pouca ou nenhuma atividade da enzima telomerase, e seus telômeros estão sujeitos a redução progressiva.<sup>16</sup> A telomerase é uma proteína essencial para o crescimento de células normais, e sua desregulação pode ter consequências diretas no envelhecimento e levar ao câncer.<sup>17</sup>

Até agora, seis grandes proteínas teloméricas foram identificadas em células humanas, quais sejam: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1 e TPP1 (anteriormente PTOP, PIP1, ou TINT1).<sup>18</sup> Essas proteínas desempenham fun-

ções distintas, mas relacionadas aos telômeros.

## Características variáveis normais dos cromossomos humanos

Alguns cromossomos humanos apresentam variações no tamanho de parte de sua estrutura, sem consequências fenotípicas.

### Heterocromatina (h) dos cromossomos 1, 9, 16 e Y

As regiões de heterocromatina presentes nos cromossomos 1, 9, 16 e Y, que coram com a técnica de bandeamento C (ver Capítulo 6), são altamente variáveis em tamanho, sendo que variações muito grandes devem ser indicadas no cariótipo.

Exemplos:

#### 46,XY,9qh+

Cariótipo masculino com um dos cromossomos 9, apresentando a região de heterocromatina aumentada.

#### 46,XX,16qh-

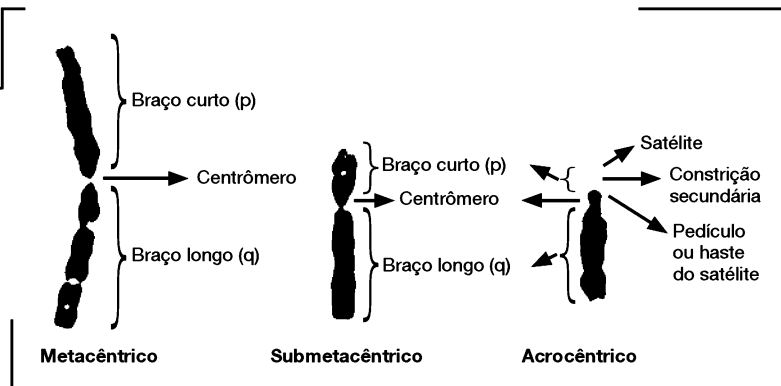
Cariótipo feminino com um dos cromossomos 1, apresentando a região de heterocromatina muito pequena.

#### 46,XYqh+

Y apresenta a região de heterocromatina aumentada.

**Figura 2.4**

**Classificação dos cromossomos humanos de acordo com a posição do centrômero (cromossomos humanos 1, 8, 14).**





## Satélites (s) e hastes dos satélites (stk) dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22

Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos que podem ser identificados pela técnica de bandeamento NOR (ver Capítulo 6) também podem apresentar tamanho variado, tanto no próprio satélite quanto na haste do satélite ou pedículo (Figura 2.4). Essas variações podem ser apontadas no cariótipo.

Exemplos:

**46,XX,21pstk+**

Cariótipo feminino, apresentando um dos cromossomos 21 com a haste do satélite aumentada.

**46,XY,13ps+**

Cariótipo masculino, apresentando o satélite de um dos cromossomos 13 aumentado.

## Referências

- Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*. 1974 May 24;184(139):865-8.
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at a resolution. *Nature*. 1984 Oct 11-17;311(5986):532-7.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):251-60.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*. 2002 Jun 21;319(5):1097-113.
- Woodcock CL, Skoultschi AI, Fan Y. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res*. 2006;14(1):17-25.
- Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. X ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):138-41.
- Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Côté J, Khochbin S, et al. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):1033-41.
- Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci*. 2004 Nov 1;117(Pt 23):5461-77.
- Weaver BA, Cleveland DW. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10103-5.
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2539-42
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 2000;34:331-358.
- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001 Sep 21;106(6):661-73.
- Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:337-65.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J. Fundamentos da biologia celular: uma introdução a biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed; 1999.
- Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 17;106(11):4360-5.
- Akiyama M, Hideshima T, Munshi NC, Anderson KC. Telomerase inhibitors as anticancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002 Sep;2(5):567-75.
- Shay JW. Telomerase and cancer: diagnostics, prognostics and therapeutic implications [Internet]. Association for Molecular Pathology. Annual meeting of the association for molecular pathology-1995. Bethesda: AMP; 2010. [Capturado em 2010 Jun 12]. Disponível em: <http://www.amp.org/meetings/>. [acesso restrito]
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer, and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):611-22.

## Leituras recomendadas

- Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc*. 2001 Aug;49(8):1105-9.
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2539-42
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005 Sep 15;19(18):2100-10.

- Dorigo B, Schaleh T, Bystricky K, Richmond TJ. Chromatin fiber folding requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol.* 2003 Mar 14;327(1):85-96.
- Guerra M. Introdução a citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
- Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974 May 24;184(139):868-71.
- Maresca TJ, Heald R. The long and the short of it: linker histone H1 is required for metaphase chromosome compaction. *Cell Cycle.* 2006 Mar;5(6):589-91.
- Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KH. Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):261-82.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet.* 2000; 34:331-358.
- Natarajan S, McEachern MJ. Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(13):4512-21.
- Voullaire LE, Slater HR, Petrovic V, Choo KH. A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: Activation of a latent centromere? *Am J Hum Genet.* 1993 Jun;52(6):1153-63.
- Watson JD, Crick FHC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953 May 30;171(4361):964-7.

# Ciclo celular

## Introdução

Em organismos unicelulares, existe uma pressão seletiva para que cada célula cresça e se divida o mais rápido possível, porque a reprodução celular é responsável pelo aumento do número de indivíduos. De um modo geral, podemos identificar em organismos multicelulares a presença de dois tipos de células: as somáticas e as reprodutoras. As primeiras se dividem através de um processo chamado de mitose, no qual a célula-mãe dá origem a duas células-filhas, com o número idêntico de cromossomos da célula-mãe. Já as reprodutivas formam-se através da meiose, que é um processo de divisão celular em que a célula de origem forma quatro outras, com a metade dos cromossomos da célula inicial. Tais processos serão mais profundamente abordados a seguir.

Nos humanos, a carga genética das células somáticas é de 46 cromossomos, sendo, portanto, diploides ( $2n$ ). As células gaméticas são chamadas de haploides, uma vez que possuem 23 cromossomos, pois na meiose os homólogos se separam e somente no momento da fecundação, onde um óvulo une-se a um espermatozoide, é restabelecido o número de cromossomos normal da espécie ( $46 - 23$  cromossomos autossômicos e dois sexuais).

## Ciclo celular

A divisão celular é uma sequência de eventos na qual o crescimento da célula ocorre pela replicação de todos os seus componentes, com a posterior divisão em duas células-filhas.

Então, cada uma das células-filhas recebe toda a maquinaria e as informações necessárias para repetir o processo.<sup>1</sup>

Apesar de espécies unicelulares, tais como leveduras e bactérias, se dividirem para gerar novos organismos, a seleção natural favorece as células que mais rapidamente crescerem e se dividirem, sobrevivendo as melhores. Sua proliferação é restrita à disponibilidade de nutriente e à exigência eventual de acasalamento sexual.<sup>2</sup> Em espécies multicelulares, os diversos ciclos de divisão celular que ocorrem necessariamente, inclusive em indivíduos adultos, servem para substituir as células que são danificadas, funcionalmente deficientes ou perdidas por morte celular programada, tendo uma importante influência na saúde, prevenindo até mesmo o câncer.<sup>3</sup> Assim, um adulto humano precisa manufaturar milhões de células novas a cada segundo simplesmente para manter um estado de equilíbrio, e se a divisão celular for danificada, por exemplo, por uma dose grande de radiação ionizante, o indivíduo morrerá em poucos dias.<sup>4</sup>

Para produzir e manter a intrincada estruturação do organismo, as células componentes precisam obedecer a controles rígidos que limitam sua proliferação. Em outro dado instantâneo, a maioria das células no adulto não está crescendo ou se dividindo, mas sim em estado de repouso, realizando funções especializadas enquanto não está sofrendo divisão celular. Somente nutrientes não são suficientes para que a célula de um organismo multicelular cresça e se divida: a célula necessita receber sinais positivos específicos de outras células. Muitos desses sinais são proteínas chamadas de fatores de crescimento, os quais se ligam a receptores complementares situados na membrana plasmática para estimular a prolifera-

ção celular. Estes sinais positivos agem anulando controles negativos intracelulares que poderiam restringir o crescimento e bloquear o funcionamento do sistema-controle do ciclo celular. Assim, enquanto uma levedura bem nutrida se prolifera a menos que receba um sinal negativo para repousar, uma célula animal repousa a menos que receba um sinal positivo para proliferar.<sup>2</sup>

A célula é encaminhada à progressão no ciclo por mecanismos de regulação relacionados ao crescimento, à multiplicação, à diferenciação celular, à reposição de células mortas, à regeneração de partes danificadas de tecidos ou órgãos e à condição de latência. Quando ocorre falha nesses mecanismos, as células podem sofrer apoptose (morte celular programada descrita no capítulo de controle do ciclo celular) – por esse meio, o organismo controla e mantém constante o número de células de tecidos e órgãos, livra-se de células danificadas e, ainda, elimina células indesejáveis e não gênese. Se o balanço entre a proliferação celular e a apoptose não for bem regulado, pode ocorrer o desenvolvimento de um tumor.

Devemos considerar dois momentos do ciclo celular: o que está entre as duas divisões, onde há o crescimento da célula, denominado *intérfase*, e a divisão propriamente dita, pela qual se originam duas células-filhas e que se caracteriza pela divisão do núcleo chamada de *mitose*, seguida pela divisão do citoplasma ou *citocinese*.

A célula passa a maior parte do tempo em *intérfase*, mas através de sinais químicos externos (hormônios e fatores de crescimento) ou internos (ciclina e quinases – CDKs), a célula é sinalizada para entrar em divisão. Estes sinais que controlam o ciclo provêm de fora para dentro da célula, pois os fatores de crescimento liberados ligam-se aos receptores de membrana das células-alvo e estes vão estimular a produção de sinalizadores intracelulares, ativando a cascata de fosforilação intracelular e induzindo a expressão de genes que são essenciais para o controle do ciclo celular (composto por CDKs e ciclina, descritas em detalhe no capítulo de controle do ciclo celular).

Antigamente, o ciclo celular era monitorado pela observação de eventos de segregação cromossômica por microscopia óptica e

replicação do DNA, medindo-se a incorporação de precursores radioativos pelo DNA. Experimentos mais recentes forneceram perspectivas mais novas e mais simples mostrando que um sistema-controle do ciclo celular é que coordena o ciclo como um todo. As proteínas deste sistema-controle apareceram primeiramente há mais de um bilhão de anos e foram tão bem conservadas que muitas delas funcionam perfeitamente quando transferidas de uma célula humana para uma levedura. Sendo assim, podemos estudar o sistema-controle em uma variedade de organismos eucariontes e usar os resultados de todos eles para montar um quadro unificado de como as células crescem e se dividem.<sup>4</sup>

A duração do ciclo mitótico pode variar de acordo com os diferentes organismos e tecidos. Parece que a regra geral é quanto maior a quantidade de DNA, maior a duração do ciclo mitótico. Os ciclos celulares mais curtos que se conhece são os de embriões de moscas, cada um durando somente oito minutos, enquanto os ciclos celulares de uma célula hepática de mamífero podem durar mais de 12 meses.

## Intérfase

É o período do ciclo celular em que a célula aumenta o seu volume e duplica os cromossomos. Erroneamente, era dito que a célula está em repouso nesta fase: nela, não só ocorre o crescimento contínuo da célula como também operam mecanismos de controle cruciais para o desenvolvimento coordenado dos ciclos de crescimento, replicação e divisão celular, fazendo com que outras estruturas celulares também se preparem para a divisão.

Como foi dito anteriormente, a célula passa a maior parte da vida em *intérfase*, sendo esta a mais demorada. Para melhor entendimento, ela é classificada como três períodos:  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$  (**Figura 3.1**), que podem ser estudados pela utilização de precursores radioativos ou por citofotometria. O primeiro método tem como princípio o uso de precursores radioativos do DNA como a timidina tritiada, que, quando processados, possibilitam a visualização do fato de a célula estar ou não em divisão; já o segundo método também mede a quantidade de DNA de células individuais em população celular, mas utiliza corantes específicos para

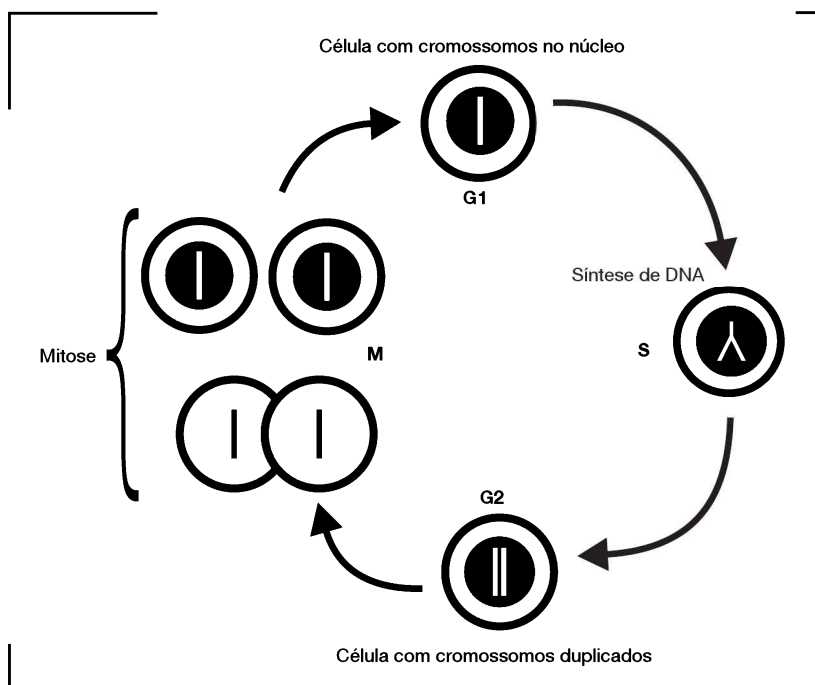
DNA ou corantes fluorescentes que se ligam a pontos específicos da molécula de DNA.<sup>5</sup>

Antes que a célula possa se dividir, ela tem que crescer até alcançar um tamanho adequado e constante. Em função disso, cerca de 95% do ciclo são gastos na intérfase, mas o tempo médio varia muito de acordo com a célula e suas condições fisiológicas, como idade celular, disponibilidade de hormônios e de fatores de crescimento, temperatura, pressão osmótica, pressão hidrostática e pressão de oxigênio externo, e mesmo com o ritmo circadiano que ocorre em animais.<sup>6</sup>

O material da célula encontra-se total ou parcialmente descondensado, sendo este o mesmo que preenche a maior parte do núcleo interfásico, denominado cromatina. Quando vista em microscópio óptico ou eletrônico, é possível notar que existe diferença entre tecidos animais. Entretanto, existe certa constância dentro do indivíduo, havendo variações entre as espécies.

Nas fases G (*gaps*, que significa intervalo), a quantidade de DNA celular se mantém constante em função do tempo, mas na fase S é que ocorre a duplicação das cromátides. No período G<sub>2</sub>, toda a síntese de RNA e de proteínas

que estava inativa na mitose volta a funcionar e, com isso, ocorre o crescimento das células. Começam a ser sintetizadas proteínas, lipídeos e glicídeos.<sup>7</sup> Tais moléculas serão utilizadas na formação da membrana celular das duas novas células. Cerca de 80% do RNA sintetizado são constituídos de RNAr. Ao longo da fase, existem picos de síntese de proteínas; algumas, porém, apresentam picos durante o intervalo. Enzimas tais como as catalisadoras da síntese de trifosfatos de desoxirribonucleosídeos e da síntese das DNA-polimerases e as ativadoras dos genes que codificam as proteínas histônicas, devem ocorrer nesse período porque aumentam sua quantidade na fase S. Nesse período também começam a ser evidenciados os primórdios de novos centríolos. Muito da importância do período G<sub>1</sub> deriva do seu papel controlador de uma decisão celular essencial: continuar proliferando ou retirar-se do ciclo e entrar em G<sub>0</sub>. Essa decisão de sair da fase G<sub>1</sub> e começar um novo ciclo de síntese de DNA e mitose também é chamada de *start*,<sup>8</sup> sendo esse fenômeno determinado primariamente por sinais extracelulares, como fatores de crescimento, que desencadeiam várias respostas intracelulares, bem como por uma avaliação sobre se a massa celular é suficiente



**Figura 3.1**

Ciclo celular.

para dar suporte a um ciclo de divisão celular. Isso, por sua vez, é monitorado por controladores internos do ciclo, constituídos por diversos componentes proteicos, que agem introduzindo ou impedindo a progressão do ciclo.<sup>2</sup> Esta é a etapa mais variável quanto à duração, podendo ocupar 30 a 50% do tempo total do ciclo interfásico ou faltar totalmente em células de divisão rápida, como por exemplo as do embrião em fase inicial dos 90 mamíferos e as formas inferiores como as leveduras.<sup>9</sup>

A fase S é marcada pela síntese de DNA e a síntese de histonas.<sup>10</sup> Na grande maioria dos casos, é um ponto em que não há retorno, levando necessariamente à divisão celular. Durante essa fase, a quantidade de DNA é duplicada perfeitamente, devido a este evento chamado de replicação. A replicação do DNA consiste basicamente no rompimento das fracas pontes de hidrogênio entre as bases, deixando um único filamento de DNA, com duas bases não pareadas. À medida que a molécula vai se desenrolando (processo que pode ser comparado à abertura de um zíper), separam-se os dois filamentos de DNA, tendo como resultado a formação de uma *bolha de replicação*, que subsequentemente se estende assumindo uma forma de Y chamada de forquilha de replicação. Assim, a quantidade de DNA, que era de 2C, passa a ser de 4C para que em cada célula-filha a quantidade 2C de DNA seja mantida. Durante a replicação, as duas fitas do DNA original são copiadas, originando duas células-filhas, cada qual com somente uma das fitas recém-sintetizadas. O pareamento consiste de adenina com timina e citosina com guanina. Por esta razão, a replicação é chamada de semiconservativa, pois cada nova molécula de DNA é a cópia perfeita de uma molécula preexistente. Essa etapa pode ocupar aproximadamente 35 a 45% do ciclo interfásico.<sup>9</sup>

Quando os cromossomos são duplicados, as duas cópias de cada cromossomo replicado permanecem firmemente ligadas como cromátides-irmãs idênticas. As cromátides-irmãs estão unidas por um complexo de multissubunidades proteicas denominadas coesinas, as quais são depositadas ao longo da extensão de cada cromátide-irmã durante a replicação do DNA. Esta coesão entre as cromátides-irmãs é fundamental para o processo de segregação cromossômica, sendo

rompida somente no final da mitose (no início da anáfase), permitindo que as cromátides-irmãs sejam separadas.<sup>4</sup>

É na fase  $G_2$  que começam os preparativos para que a célula entre em divisão. Para isso, o DNA passa por um processo de reparo, caso tenha acontecido algum erro na replicação. O mecanismo ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que a célula tem uma sinalização para que permaneça temporariamente em  $G_2$  caso ainda não tenha replicado ou reparado por completo seu genoma. Isso pode ocupar cerca de 10 a 20% do ciclo interfásico.<sup>9</sup> As proteínas e enzimas envolvidas no processo de controle do ciclo celular serão discutidas posteriormente.

Alguns fenótipos celulares não se dividem. Estas células frequentemente são consideradas por se afastarem do ciclo celular em outro estado, lembrando  $G_1$ , mas diferente deste porque são incapazes de realizar a fase S. Este estado acíclico é chamado de  $G_0$ . Certos tipos celulares podem ser estimulados a deixar  $G_0$  e a re-entrar no ciclo celular. O afastamento ou a re-entrada no ciclo podem ocorrer antes do ponto de restrição em  $G_1$ .<sup>2</sup>

O estado  $G_0$  é distinto de qualquer outro no ciclo onde as células proliferam. A velocidade de síntese proteica, por exemplo, é reduzida dramaticamente, podendo atingir 20% do seu valor em relação às células em fase de proliferação. Deste modo, a ausência de fatores de crescimento apropriados leva a célula a um tipo de ciclo celular sonolento, onde o sistema-controle do ciclo não consegue fazer com que a célula ultrapasse o ponto  $G_1$ . Privando-se a célula de nutrientes, tais como aminoácidos, também ocorre uma parada de crescimento e um bloqueio na passagem do ponto  $G_1$  (**Quadro 3.1**).<sup>11</sup>

É a habilidade de entrar em  $G_0$  que é responsável pela enorme variabilidade da extensão do ciclo celular em organismos multicelulares. No corpo humano, por exemplo, algumas células não se dividem, como é o caso de neurônios e das células do músculo esquelético; já certas células epiteliais do intestino se dividem mais de duas vezes ao dia para renovar o epitélio intestinal diariamente.<sup>2</sup>

A velocidade com que a célula se divide varia de acordo com as circunstâncias externas, assim como com a característica interna de

cada tipo de células. Por exemplo, a perda de sangue estimula a proliferação de precursores de células sanguíneas. Quase todas as variações na velocidade de proliferação do corpo de um adulto dependem do tempo que as células gastam entre a mitose e o ponto  $G_1$ , com as células que se dividem lentamente permanecendo em estado de  $G_0$  por semanas ou mesmo anos. Por outro lado, o tempo que a célula leva para ir do início da fase S até a mitose costuma ser rápido (tipicamente de 12 a 24 horas em mamíferos) e notoriamente constante, não dependendo do intervalo de uma próxima divisão (**Figura 3.2**).<sup>2</sup>

## Mitose

O processo de crescimento dos organismos e a reposição das células mortas são de responsabilidade da mitose. Ao final de todas as etapas da mitose ocorre a repartição exata do material nuclear para as células-filhas, o material que se replica na intérfase e se divide em cromossomos-filhos, os quais segregam na anáfase formando, junto aos outros cromossomos, um conjunto no núcleo das células-filhas. Estas células são submetidas a uma alteração regular de replicação e segregação cromossômica.

Curioso é observar que em todos os organismos estudados a sequência de eventos na mitose e na meiose é basicamente igual, mesmo que estejamos falando de uma porífera ou um vertebrado, um musgo ou uma angiosperma. Sugere-se que a origem desses processos tenha ocorrido antes do surgimento dos organismos pluricelulares e esses, por sua vez, teriam uma origem em comum.<sup>12</sup>

O ciclo celular pode variar em diferentes épocas do desenvolvimento, por isso mitoses rápidas habilitam o desenvolvimento do

embrião e do feto a um crescimento surpreendentemente rápido. Ao nascer, a taxa mitótica diminui de maneira espantosa. Mais tarde, a mitose deve ser altamente regulada para manter o número e os arranjos de células especializadas que compõem os tecidos e órgãos. Embora a mitose normalmente leve apenas uma ou duas horas para se completar, essa parte do ciclo celular envolve muitos processos críticos e complexos. Por esta razão, a mitose é dividida em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase.

**Prófase:** Durante a intérfase, os cromossomos não são visíveis ao microscópio óptico. Somente a partir desta fase é possível sua visualização, pois ocorre a condensação da cromatina (fibras de nucleoproteínas) dos cromossomos dos eucariotos, passando de filamentos compridos e finos para mais curtos e grossos, gradualmente formando espirais. Eles são chamados de cromonema, formando por condensação o cromossomo metafásico e por descondensação a cromatina difusa do núcleo interfásico.<sup>12</sup> As duas cromátides-irmãs de cada cromossomo se alinham juntas, unidas por um ponto denominado centrômero (**Figura 3.3a**). A membrana nuclear se dissolve, os nucléolos desaparecem, os cromossomos se espalham e é formado o fuso acromático, que é constituído de microtúbulos, que são formados por uma proteína chamada de tubulina e visíveis ao microscópio como fibras em fuso. Essas fibras ligam o cinetócoro, que interage com microtúbulos do fuso durante o movimento dos cromossomos na divisão celular. Finalmente, seu aspecto tem os cromossomos já razoavelmente bem condensados ainda espalhados no núcleo, o que é conhecido como prometáfase.

**Metáfase:** O início dessa fase é dado pelo alinhamento dos cromossomos na região equatorial da célula, chamada de placa meta-

### QUADRO 3.1

#### Fitoemaglutinina (PHA)

A PHA é agora o mitógeno mais comumente usado para estimular os linfócitos T para o cariótipo constitucional. Trata-se de uma glicoproteína que se liga às membranas das células e altera suas propriedades. É notado que ela muda a permeabilidade da membrana, levando a uma captação molecular aumentada, que, em retorno, ativa a síntese macromolecular, levando a célula a entrar no ciclo celular.



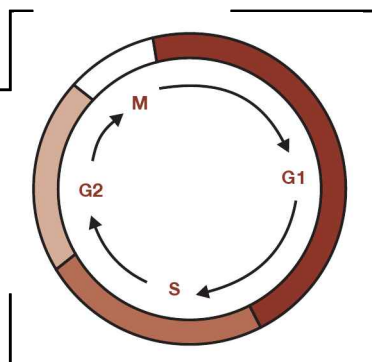
fásica. As forças que mantêm os cromossomos nessa posição estão igualmente distribuídas entre os dois polos da célula pelos microtúbulos do fuso (**Figura 3.3b**). Os hemifusos são compostos de três tipos de fibras: as polares, que partem dos centrosomos localizados nos dois polos opostos e que se interdigitam na região central da célula, sem alcançar o polo oposto; as cinetocóricas, que ligam cada cromossomo aos dois polos opostos; e as fibras livres, mais curtas e não ligadas aos polos ou aos cinetócoros, de origem e função desconhecidas (**Quadro 3.2**). Nesta fase, os cromossomos são facilmente analisados devido à sua maior condensação e individualização. Este é o momento em que as cromátides se tornam visíveis ao microscópio óptico.<sup>6</sup> A observação é otimizada quando se aplicam substâncias antimitóticas, como a colchicina, que se liga às proteínas que formam o fuso acromático, denominadas tubulinas, impedindo sua polimerização e consequentemente inibindo a formação das fibras ou, ainda, inativando os fusos já formados. Desta forma, os cromossomos permanecem em metáfase, facilitando o diagnóstico dos distúrbios cromossômicos.

**Anáfase:** O início da anáfase se dá quando o centrômero separa as cromátides-irmãs devido a um encurtamento das fibras do fuso que partem do cinetócoro a um dos polos da célula. Esse encurtamento ocorre porque há uma perda de dímeros de tubulina nas extremidades polares, aproximando, assim, os cromossomos-filhos dos polos (**Figura 3.3c**). Ao mesmo tempo, moléculas de tubulina são adicionadas às extremidades livres dos microtúbulos polares, que ao crescerem aumentam a distância entre os polos. Proteínas motoras como a dineína são responsáveis por ajudar no

deslizamento das fibras polares do fuso, que são interdigitadas na porção central. Ainda hoje o mecanismo de migração não é muito conhecido, mas sabe-se que é dependente dos microtúbulos, pois se estes estão despolimerizados pela colchicina, por exemplo, as células param em metáfase. Ao final da anáfase, a célula contém 92 cromossomos separados, metade disposta próxima a um dos lados da célula e metade disposta próximo ao outro lado. Se todo processo de separação ocorreu normalmente, os grupos de cromossomos são idênticos. Porém, em idade avançada e por várias outras razões, pode haver uma não disjunção, ou seja, uma falha da segregação ordenada dos cromossomos-filhos, resultando em anormalidades cromossômicas.<sup>13</sup> A anormalidade cromossômica clinicamente significativa é a aneuploidia (número anormal de cromossomos devido a um exemplar extra ou inexistente).

**Telófase:** Seu início apresenta os cromossomos muito unidos e em alta condensação, o que dá origem a núcleos pequenos e bem densos, já não permitindo mais sua visualização ao microscópio óptico de forma individual. Os cromossomos-filhos se dirigem aos respectivos polos, o que leva ao desaparecimento dos microtúbulos cinetocóricos (**Figura 3.3d**). Agora, cada um dos polos apresenta um conjunto de 46 cromossomos. No final da telófase, os núcleos apresentam-se relativamente maiores, pois dão lugar aos cromocentros e à cromatina difusa. Os núcleos são, então, reconstruídos e ocorre a divisão citoplasmática, que dá origem às células-filhas (**Figura 3.3e**). Pode-se dizer que alguns fenômenos que ocorrem na telófase são o inverso do que ocorre na prófase: os nucléolos reaparecem,

**Figura 3.2**  
Tempo médio das diferentes fases do ciclo celular.





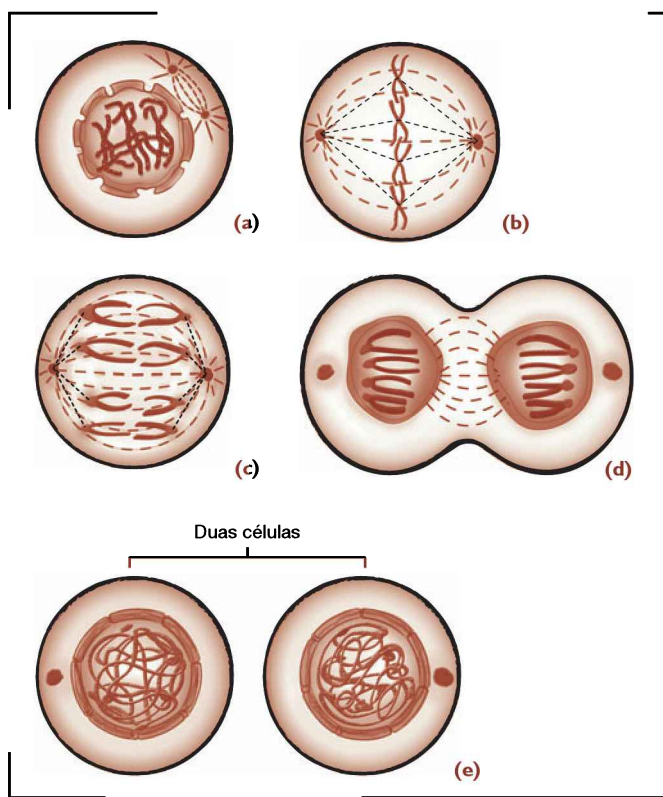
enquanto o cromonema e o fuso acromático desaparecem.

**Citocinese:** Para produzir duas células-filhas geneticamente idênticas, a célula tem que separar os cromossomos replicados e alocar uma cópia de cada célula-filha. Em todas as estruturas eucarióticas, essa função é realizada, durante a mitose, por um fuso mitótico bipolar, o qual é composto de microtúbulos e de várias proteínas que interagem com ele, incluindo as proteínas motoras microtúbulo-dependentes. As diferentes estruturas do citoesqueleto são responsáveis pela citocinese. Em células animais e em muitos eucariotos unicelulares, esta estrutura é denominada

anel contrátil, que contém filamentos de actina e miosina, formando-se no plano perpendicular à célula, exatamente abaixo da membrana plasmática. À medida que o anel se contrai, ele puxa a membrana para dentro, dividindo a célula em duas.

### Erros na mitose

A mitose normal é caracterizada pela alternância regular da reprodução cromossômica e da segregação dos cromossomos-filhos. Os dois processos não estão necessariamente vinculados, podendo mudar suas relações em diferentes formas.<sup>14</sup>



**Figura 3.3**

(a) Os cromossomos replicados, cada um consistindo de duas cromátides-irmãs intimamente associadas, se condensam. O fuso mitótico se forma fora do núcleo e entre os dois centríolos, que foram replicados e se separam. (b) Os cromossomos encontram-se alinhados na placa metafásica do fuso mitótico, entre os dois polos. Os microtúbulos do cinetócoro fixam as cromátides-irmãs aos polos opostos ao fuso mitótico. (c) As cromátides-irmãs se separam de forma sincronizada em direção aos polos. Os microtúbulos do cinetócoro se encurtam e os fusos polares também se distanciam, separando os cromossomos. (d) Durante a telófase, os dois conjuntos de cromátides-irmãs chegam aos polos do fuso mitótico e se descondensam. Ao redor de cada grupo de cromossomos-filhos, é constituído um novo envelope nuclear, marcando o final da mitose. A divisão do citoplasma começa, com a formação do anel contrátil. (e) Os núcleos das células-filhas são reconstituídos.

Com exceção das mitoses multipolares, todas as outras se caracterizam pela ausência do fuso mitótico ou pela produção de um fuso defeituoso e, na maior parte dos casos, isso acaba originando a duplicação do número de cromossomos.<sup>15</sup>

Irregularidades mitóticas acontecem tanto em anáfases quanto na distribuição desigual dos cromossomos para as células-filhas, podendo resultar em aneuploidia ou euploidia celular. A restituição e a mitose sem divisão celular, assim como a fusão celular, originam a poliploidia ou a formação de células multinucleares.<sup>16</sup>

**Endorreduplicação:** É a modificação mais comum da mitose, na qual os cromossomos se replicam duas ou mais vezes entre as mitoses ao invés de somente uma vez como na mitose normal.<sup>17</sup> Depois de três ou quatro endorreduplicações, podem ser observados feixes constituídos de 8 a 16 cromátides, respectivamente. Estudos recentes mostram que endociclos utilizam praticamente a mesma maquinaria regulatória das fases  $G_1/S$  da mitose, com alguns informativos e algumas alterações complexas.<sup>18</sup>

A endorreduplicação ocorre ocasionalmente em todos os tecidos. Por exemplo, no cultivo de fibroblastos de humanos, de 3 a 5% das células em divisão apresentam um número de cromossomos tetraploide (algumas são octaploides), enquanto que essa divisão é rara nos linfócitos em cultivo.<sup>19</sup> Ressalta-se que a endorrepliação é o modo mais comum de poliploidização<sup>15</sup> e que, embora às vezes os endociclos sejam excluídos como uma particularidade evolutiva, eles estão disseminados em protistas, plantas e muitos animais, incluindo artrópodos, moluscos e mamíferos.<sup>18</sup>

**Politenia:** Politenização é uma modificação da endorreduplicação na qual as cromá-

tides homólogas replicadas seguem unidas, dentro de células hipertróficas, mantendo-se morfológicamente distintas. O exemplo mais conhecido são os cromossomos gigantes das glândulas salivares de dípteros.<sup>15,20</sup>

Pearson,<sup>21</sup> em 1974, sugeriu que politenia pode ser uma adaptação celular do período larval, ou seja, o crescimento extremo exigido continuamente, a rápida ingestão alimentar e o posterior acúmulo de gordura no corpo, reserva que será posteriormente implantada no complexo morfogenético por causa da metamorfose.

Os cromossomos politênicos não se limitam aos insetos, mas também se encontram em algumas células especializadas de plantas<sup>22,23</sup> e em células trofoblásticas gigantes de coelhos, ratos e camundongos. Entretanto, ainda não se sabe se também existem cromossomos politênicos em células gigantes humanas.<sup>24</sup>

**Endomitose:** A endomitose ocorre porque a membrana nuclear não se desintegra e os cromossomos continuam se contraindo. Quando atingem o máximo de condensação durante a metáfase, as cromátides-irmãs se separam na anáfase, porém não se deslocam para os polos. Os cromossomos entram então em telófase e o núcleo retorna à intérfase, duplicando o número de cromossomos.<sup>15</sup>

As células endomitóticas foram descritas também em células cancerosas de ratos e de seres humanos.<sup>17,25,26</sup> Em humanos, os tecidos que normalmente apresentam a endomitose são os da placenta;<sup>27</sup> nas células endomitóticas das molas hidatiformes, os cromossomos se replicam de forma não sincronizada, permanecendo parte deles condensada durante todo o tempo.<sup>28</sup> Outro exemplo em humanos é o dos megacariócitos, responsáveis pela formação das plaquetas a partir da sua fragmentação – daí a importância desse processo, que

### QUADRO 3.2

#### Coesinas

Durante a mitose e a meiose, as cromátides-irmãs estão ligadas por um complexo de proteínas. Essa coesão é importante não só para o pareamento e o alinhamento dos cromossomos sobre o fuso mitótico, mas também para a geração de tensão em todo centrômero – que contraria a força de tração dos microtúbulos do fuso, assegurando a ligação bipolar dos cromossomos. A coesão entre os cromossomos permite, portanto, uma segregação precisa destes tanto na mitose como na meiose.

está associado ao volume citoplasmático dos megacariócitos e, indiretamente, à formação de plaquetas.<sup>29</sup>

**Mitose C:** Levan descreveu a mitose C em 1938 como a inativação do fuso, seja pela sua ausência completa ou por ser defeituoso, seguida por um espalhamento ao acaso dos cromossomos na célula.

Compostos que interferem com a divisão do núcleo celular na mitose C, como, por exemplo, a colchicina, são classificados como fusos venenos, venenos mitóticos ou compostos antimitóticos.<sup>30</sup> Esse tipo de erro não é frequente em células normais, porém é bastante descrito em células cancerosas de mamíferos.<sup>15</sup>

### *Anormalidades na polaridade e na simetria do fuso*

**Mitose multipolar:** É o oposto da ausência ou falha do fuso celular, pois, neste caso, ocorrem mais comumente fusos com três polos, seguidos de mitoses quadripolares. Ela pode ser definida pela presença de mais de um fuso acromático em qualquer fase do ciclo mitótico, sendo um dos mais marcantes tipos de erro na segregação da mitose, uma vez que afeta toda arquitetura do ciclo celular.<sup>31</sup> A maioria dos fusos tripolares e quadripolares ocorre quando um ou dois centrossomos se dividem duas vezes durante o ciclo mitótico<sup>32</sup> e não como resultado de fusões celulares ou nucleares, como se supunha anteriormente. Tal como as outras anormalidades mitóticas, as divisões multipolares são frequentes nos tumores malignos; porém, são praticamente inexistentes em células normais não tratadas,<sup>25,33</sup> isso porque as células normais têm um complexo sistema de *checkpoint* para a proteção contra os eventuais efeitos nefastos da mitose multipolar.<sup>34</sup>

**Mitose bipolar assimétrica:** Em 1891, Hanseman<sup>35</sup> criou uma teoria de que a carcinogênese tinha como base principalmente as observações de “células com divisões assimétricas”. Como mencionado anteriormente, mitoses multipolares assimétricas ocorrem muitas vezes também no sentido em que ambos os eixos da metáfase ou os polos da anáfase parecem ser desiguais em tamanho.<sup>31</sup> A divisão dessas células poderia resultar em células-

-filhas com uma grande alteração no número de cromossomos e, assim, ser um mecanismo eficiente para a diversidade genética. No entanto, desde os tempos de Hanseman, este tipo de mitose tem sido submetido apenas a um pequeno número de investigações sistêmicas.<sup>36,37</sup>

### *Anormalidade na segregação das cromátides-irmãs*

**Ponte nucleoplasmática:** Pode ser definida como uma sequência contínua da cromatina com alongamento de um polo da anáfase para o outro. Pontes nucleoplasmáticas podem ainda ser subclassificadas em pontes de cromátides ou de cromossomos.<sup>38</sup> As pontes de cromátides são causadas pela fusão da cromátide-irmã antes da separação dos centrômeros na anáfase, resultando no alongamento do material do DNA intercentromérico. Este material esticado é constituído por duas cópias espelhadas do mesmo segmento cromossômico e, em seguida, geralmente se rompe em um ou mais locais, resultando em alterações cromossômicas estruturais e/ou perda de cromossomo material.<sup>39,40</sup>

Vários estudos têm demonstrado que este ciclo contínuo de rearranjo estrutural do genoma pode ser um importante mecanismo para a amplificação genômica no câncer.<sup>41-44</sup> Essas mudanças estruturais também resultam na perda de cromossomos inteiros e/ou na inibição da citocinese.<sup>40,45</sup>

As pontes nucleolares podem ser causadas por praticamente todos os processos que acionam a quebra das duas fitas de DNA, tais como radiação ionizante ou produtos químicos clastogênicos.<sup>31</sup>

**Cromossomos retardatários:** Cromossomos que foram deixados para trás na anáfase e/ou telófase podem ser perdidos a partir dos núcleos das células-filhas.<sup>46</sup> A falta de uma definição geral para cromossomos retardatários e o fato de que poderiam ser produzidos como artefatos em células submetidas a soluções hipotônicas têm, de certa forma, limitado estudos experimentais dos cromossomos retardatários. No entanto, estudos recentes com imagens de *real-time* sobre câncer de colo retal em linhagens celulares têm mos-

trado que esses cromossomos deixados para trás muitas vezes têm como causa o apego de ambos os cinetócoros de um cromossomo ao mesmo fuso polar (junção merotética).<sup>31</sup> Os mecanismos subjacentes a esses defeitos são desconhecidos, mas disfunções do *checkpoint* na via de montagem do fuso, por exemplo, e/ou mutações inativadoras do gene BUB1A<sup>47</sup> provavelmente desempenham um papel importante ao permitir a biorientação de todos os cromossomos antes da anáfase.<sup>31</sup>

**Fragmentos retardatários de cromatina:** Estas estruturas são cromatinas incapazes de fornecer um local para a constituição efetiva do cinetócoro, normalmente por falta das sequências repetitivas da região centromérica. Portanto, os fragmentos deixam de interagir com o fuso mitótico e podem ser deixados para trás em ambas as fases, tanto na metáfase quanto na anáfase. Assim como os cromossomos dicêntricos, eles são formados por quebras de cadeia dupla de DNA e parece que consistem de uma ou duas cromátides-irmãs com base na ruptura de DNA que ocorreu antes ou após a replicação. Como não podem interagir com as proteínas do fuso, os fragmentos acêntricos tendem a se perder a partir da anáfase das células-filhas. Formação e perda de fragmentos acêntricos são, assim, um possível mecanismo de perdas parciais de cromossomos (deleções). Com a formação de neocentrômeros, os fragmentos acêntricos passam a ser transformados em cromossomos marcadores.<sup>31</sup>

Outra notável exceção à regra de que fragmentos acêntricos são perdidos durante a mitose são os pequenos episômos, conhecidos como *double-minutes* (**Figura 3.4**), que, muitas vezes, atuam como veículos de oncogenes ou genes de resistência aos fármacos em células tumorais. Mesmo que estas estruturas circulares de DNA não tenham centrômero, elas geralmente não ficam para trás durante a anáfase, uma vez que podem aderir às regiões distais dos cromossomos e os acompanhar para o núcleo das células-filhas sem sofrer separação das cromátides-irmãs.<sup>48</sup>

A ausência de grandes alterações na morfologia de uma célula mitótica não exclui, no entanto, a possibilidade de que possam vir a ocorrer erros na segregação cromossômica. Um exemplo é quando as cromátides-irmãs de um cromossomo não conseguem separar-se

enquanto se deslocam para a mesma célula-filha em anáfase. Esta não disjunção oculta iria resultar no ganho de um cromossomo inteiro em uma célula-filha e na perda de uma cópia do cromossomo em outra célula-filha.<sup>31</sup>

## Meiose

A meiose é um processo aparentemente paradoxal, onde a universalidade e a exclusividade são harmoniosamente combinadas. Todos os organismos, independentemente da sua complexidade evolutiva, reduzem meioticamente o número de cromossomos no início da reprodução sexual, para que, na formação do zigoto, o número de cromossomos seja mantido, formando uma célula diploide definida de geração em geração.<sup>49</sup>

A divisão de células somáticas resulta em células-filhas que apresentam o mesmo número de cromossomos das células de origem, chamadas de diploides ( $2n$ ). Entretanto, na gametogênese (processo de formação de gametas, descrito a seguir), o número de cromossomos se reduz à metade ( $n$ ), pois, quando um óvulo e um espermatozoide se unem para formar o zigoto, este deve ter o mesmo número de cromossomos que as células dos pais. O processo resulta na formação de quatro células geneticamente diferentes da célula-mãe e entre si. A meiose está envolvida na evolução dos seres vivos e na adaptação das espécies, pois ocorre a recombinação dos genes, o que faz compreender alguns pontos-chave da evolução, além de constituir-se na base citológica dos mecanismos de transmissão dos caracteres hereditários. Resumidamente, a meiose pode ser entendida como um processo onde ocorrem duas divisões nucleares seguidas, sem haver um período S entre elas, ocorrendo assim a redução do número de cromossomos da célula.

A fase S meiótica ocorre anteriormente à primeira divisão e em geral é mais longa do que a fase S que precede a mitose. Em ambas as situações, o DNA duplica de  $2n$  para  $4n$ . Tanto na fase S pré-mitótica quanto na fase S pré-meiótica ocorre a duplicação precoce da eucromatina e tardia da heterocromatina – que parece estar relacionada com o papel inicial para controlar alguns eventos nas primeiras etapas e, por esta razão, apre-

senta 2 a 3 vezes mais heterocromatina que os núcleos mitóticos. Na meiose, ocorre uma divisão cromossômica para duas divisões celulares: a meiose I (também conhecida como divisão reducional), onde os cromossomos estão subdivididos em duas cromátides, mas seus centrômeros não; e a meiose II (também chamada de divisão equacional), que é muito semelhante à mitose, porém os cromossomos estão em número haploide. Frequentemente, elas são separadas por uma curta intérfase, chamada de intercinese, que se distingue da intérfase normal por não haver síntese de DNA. Este evento, porém, não é visto em todos organismos, de forma que a célula passa da telófase I direto para a prófase II, ou ainda da anáfase I para a prófase II. Para facilitar o estudo, a meiose também é dividida em fases, que recebem o mesmo nome que na mitose: prófase, metáfase, anáfase e telófase.

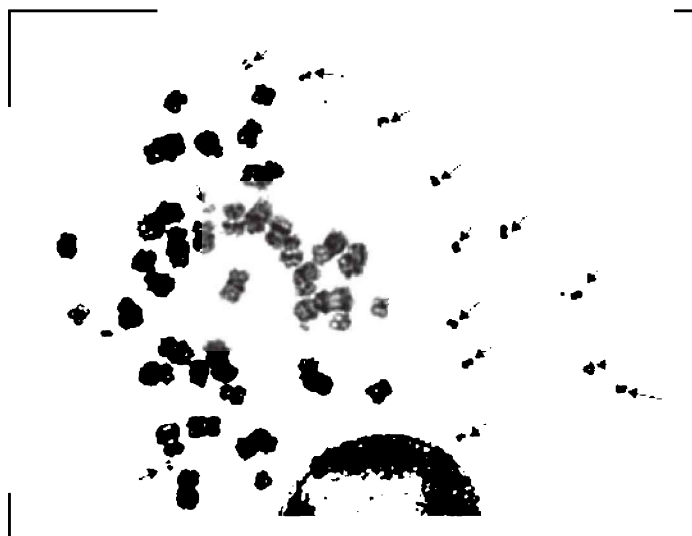
## Meiose I

A meiose inicia já com o DNA replicado, e de uma célula que era diploide passam a existir duas células haploides, o que caracteriza a fase por ser um estágio de divisão reducional. Como na mitose, a meiose se subdivide em quatro fases: prófase I, metáfase I, anáfase I e telófase I.

**Prófase I:** É a fase mais demorada da meiose porque é nela que ocorrem os fenô-

menos de maior importância biológica, como o pareamento dos cromossomos homólogos que garante a posterior disjunção dos cromossomos homólogos, de modo que ambos os núcleos-filhos dessa divisão recebam um membro de cada par de cromossomos, permitindo que ocorram quebras e trocas de segmentos entre os cromossomos homólogos de origem paterna e materna, fenômeno chamado de recombinação genética, permuta ou *crossing-over*. Para ser estudada com maior clareza, vamos subdividir a prófase em cinco subfases: leptóteno (leptonema), zigóteno (zigonema), paquíteno (paquinema), diplóteno (diplonema) e diacinese.

- **Leptóteno:** Como o nome de origem grega indica (*leptós* = fino; *tainia* = fita; *nema* = filamento), este é um estágio que se caracteriza pela visualização de cromossomos em forma de filamentos finos, geralmente formando longas alças que se prendem em um novelo central. Aparecem corpúsculos espessos, chamados de cromômeros; à medida que estes se condensam mais, os cromômeros adjacentes fundem-se em estruturas maiores. Esses grupos serão vistos como bandas escuras dos cromossomos na prófase I ou na metáfase I. Observa-se, ainda, ao nível ultraestrutural, que existe uma ligação a partir de estruturas filamentosas que estão entre as duas cromátides-irmãs de cada cromossomo. Elas são chamadas de núcleos axiais, e futuramente serão os



**Figura 3.4**

As setas mostram *double-minutes*.

elementos laterais do complexo sinaptonêmico.

- **Zigóteno:** Durante esta fase, os cromossomos vão para a extremidade e se reúnem em uma área embaixo da membrana nuclear, que fica próxima aos centríolos, mas fora do núcleo, originando uma estrutura denominada *bouquet*.<sup>15</sup> Ocorre então o pareamento dos cromossomos homólogos, denominado sinapse, que envolve uma estrutura complicada, chamada de complexo sinaptonêmico. Este complexo possui uma região central basicamente proteica, constituída por um componente central, rodeado por uma região de menor densidade e pelos próprios componentes laterais dos cromossomos homólogos.<sup>7</sup> Ao que parece, os cromossomos homólogos se “reconhecem” por uma região, provavelmente os telômeros, e a partir daí concluem o processo de pareamento,<sup>12</sup> mas não chegam a se fundir: entre eles há uma distância de aproximadamente 150 a 200 nm.<sup>6</sup> Esse pareamento ocorre não só nos cromossomos homólogos, mas também em regiões estritamente homólogas. Entretanto, nos homens, como os cromossomos X e Y são na maior parte não homólogos, eles se alinham pela extremidade, sugerindo uma homologia nesta parte. Isto é mostrado de modo convincente pela configuração resultante do aparecimento de dois homólogos, onde um dos cromossomos apresenta uma inversão. Da mesma forma, se ocorre uma translocação recíproca em um dos cromossomos, os seguimentos sinápticos correspondentes dos cromossomos translocados e não translocados origina uma estrutura característica em forma de X.<sup>15</sup>
- **Paquíteno:** Neste momento, os cromossomos aparecem mais espessos ao microscópio óptico, e por isso a fase leva este nome (do grego *pchys* = grosso). Ainda pareados e unidos pelo complexo sinaptonêmico, os cromossomos são chamados de bivalentes (já que são dois cromossomos no grupo) ou tétrades (indicando que são quatro cromátides envolvidas no grupo). Essa organização dos bivalentes assegura que regiões homólogas do DNA sejam colocadas em proximidade, de modo que é favorecida a ocorrência do evento de grande importância na meiose: a troca de

segmentos de DNA entre os cromossomos homólogos, que se denomina permuta, *crossing-over* ou recombinação genética.<sup>6</sup> Esse evento ocorre pela quebra do DNA, havendo troca entre segmentos de cromátides homólogas, o que traz como principal consequência a variabilidade genética entre as espécies. Isso explica por que cada indivíduo (exceto os gêmeos idênticos) tem várias características genéticas diferentes apresentadas entre seus irmãos e irmãs. Quando dois genes situados em um mesmo cromossomo estão muito afastados, é provável que uma permuta que ocorra os separe, fazendo-os segregarem independentemente como se estivessem em cromossomos diferentes. Quanto mais próximos um do outro estiverem os genes, menor será a chance de ocorrer permuta entre eles; portanto, menor será a proporção de células com segregação independente entre esses genes.<sup>50</sup> É provável que a recombinação gênica seja regulada por estruturas denominadas nódulos de recombinação, que estão intimamente ligados na região central do complexo sinaptonêmico; eles poderiam ter a função de fornecer a maquinaria estrutural e enzimática requerida para a realização da permuta. Devido aos acontecimentos desta fase, sabemos que, ao invés de levar algumas horas como o leptóteno e o zigóteno, o paquíteno pode durar alguns dias ou semanas.<sup>6</sup>

- **Diplóteno:** O diplóteno (do grego *diplóos* = duplo) se inicia quando os cromossomos homólogos começam a se afastar, como se estivessem sofrendo uma repulsão, porém permanecem unidos em alguns pontos ao longo das cromátides, sendo estes pontos chamados de quiasmas. Um quiasma representa um sítio no qual uma ou mais cromátides de um bivalente romperam-se em pontos correspondentes. As extremidades rompidas foram reunidas de forma cruzada, gerando novas cromátides. Cada nova cromátide consiste de material derivado de uma cromátide, de um lado do ponto de junção, e de material da outra cromátide, no lado oposto. As duas cromátides recombinantes possuem estruturas recíprocas. O evento é descrito como quebra e reunião. A sua natureza explica por que um único evento de recombina-

ção pode produzir apenas 50% de recombinantes: cada evento de recombinação envolve apenas duas das quatro cromátides associadas.<sup>2</sup> Trata-se, portanto, de uma fase de intensa atividade metabólica, o que explica a observação de que, no diplóteno da maioria das espécies, os cromossomos se tornam descompactados para permitir a transcrição de certos genes.<sup>6</sup> Na espécie humana, a gametogênese feminina tem início ainda na fase embrionária, sendo interrompida no diplóteno, que recebe então a denominação de dictióteno, estágio no qual a célula pode permanecer por anos.<sup>7,12</sup> É isso que ocorre com os ovócitos que permanecem em dictióteno desde os últimos estágios do desenvolvimento fetal até ocorrerem as ovulações menstruais, a partir dos 13 aos 14 anos. Os últimos óvulos amadurecidos terão passado então cerca de 50 anos no estágio de diplóteno.<sup>12</sup>

- **Diacinese:** A condensação cromossômica alcança sua etapa final na diacinese,<sup>15</sup> mas a característica mais importante da fase é o afastamento dos cromossomos homólogos (daí o nome grego de *dia* = através e *kinesis* = movimento), pois este leva à denominada terminalização dos quiasmas, na qual os quiasmas tendem a se mover para as extremidades dos cromossomos, como consequência de seu movimento e afastamento. Todos os cromossomos completam a terminalização, exceto os cromossomos maiores, que a completam apenas na anáfase I.<sup>7</sup> Os eventos marcantes da diacinese são o aumento da condensação cromossômica, o desaparecimento dos nucléolos, a ruptura do envoltório nuclear em pequenas vesículas, a ligação de cada cromossomo do par de homólogos às fibras do fuso, que os prendem aos polos opostos da célula, e o movimento dos cromossomos para a placa equatorial da metáfase I.<sup>6</sup>

**Metáfase I:** As fibrilas do fuso acromático começam a aparecer, ligando-se aos cinetócoros dos cromossomos. O que difere da metáfase mitótica é que a disposição dos cromossomos é diferente, pois aqui cada homólogo está preso ao fuso acromático pelo seu centrômero e suas extremidades estão voltadas para a zona equatorial da célula.<sup>7</sup>

**Anáfase I:** A principal diferença entre a anáfase mitótica e a anáfase I meiótica é que nesta não ocorre a divisão dos centrômeros, apenas a separação dos homólogos, que passam a ser chamados de díades. Estes vão para polos opostos, e a distribuição de cada par de homólogos se dá ao acaso.<sup>7,51</sup>

**Telófase I:** No momento em que as díades chegam aos polos celulares, a carioteca e o nucléolo se reorganizam, e os cromossomos se desespiralizam para enfim ocorrer a citocinese. Embora na mitose e na meiose a quantidade de DNA por núcleo seja  $2C$  e ambos tenham  $2n$  cromátides, na telófase mitótica existem, a rigor,  $2n$  cromossomos, cada um com apenas uma cromátide, e na meiótica há apenas  $n$  cromossomos, cada um com duas cromátides.<sup>12</sup>

## Meiose II

As fases da mitose e da meiose II são muito parecidas. A diferença entre elas é que se formam células haploides a partir de células haploides, pois durante a meiose II ocorre a separação das cromátides que formam as díades, indo cada uma para um polo. As fases da meiose II são prófase II, metáfase II, anáfase II e telófase II, que serão descritas a seguir.

**Prófase II:** É uma fase de curta duração, na qual os cromossomos se espessam à medida que se condensam, a carioteca desaparece e novas fibras do fuso são formadas.<sup>10</sup>

**Metáfase II:** Diferentemente da metáfase I, são os cinetócoros das cromátides-irmãs que se orientam para polos opostos da célula, prendendo-se às fibras do fuso de lados contrários, o que os deixa alinhados no plano equatorial.<sup>6,10</sup>

**Anáfase II:** Agora os centrômeros se dividem e cada um carrega uma cromátide para cada polo, porém as cromátides-irmãs podem não ser idênticas devido aos processos de formação de quiasmas e de *crossing-over* que sofreram ainda na meiose I.

**Telófase II:** Já nos polos da célula, os cromossomos começam a se distender, membranas nucleares são formadas e ocorre a citocinese, dando origem a quatro células, cada uma com número haploide de cromossomos ( $n$ ) e com quantidade  $C$  de DNA. Portanto, o núcleo de cada célula contém um quarto do



material cromossômico presente no início do processo meiótico.<sup>6,7,51</sup>

## Gametogênese

A gametogênese pode ser subdividida em duas fases:

1. Proliferação, na qual as espermatogônias e as ovogônias dividem-se mitoticamente e aumentam de número; quando cessa a proliferação, elas aumentam de volume e preparam-se para divisão meiótica, originando os espermatócitos e os ovócitos primários que já se encontram na prófase meiótica I.

2. Crescimento e maturação.<sup>52</sup>

Os estágios da meiose podem ser diretamente relacionados aos estágios da gametogênese, a formação dos gametas.<sup>10</sup> Isso porque durante esse processo o número de cromossomos é reduzido pela metade e a forma das células é modificada.<sup>53</sup> As células germinativas primordiais humanas são reconhecíveis na quarta semana de desenvolvimento fora do embrião propriamente dito, no endoderma do saco vitelino.<sup>54</sup> O processo de maturação nos homens é chamado de espermatogênese e, nas mulheres, de ovogênese.

**Espermatogênese:** Esse processo ocorre nas gônadas masculinas, os testículos. Estes órgãos são constituídos por numerosos túbulos seminíferos, que convergem a ductos comuns que levam os espermatozoides ao exterior.<sup>52</sup> Os espermatozoides são formados nos túbulos seminíferos dos testículos após a maturação sexual ser atingida. Os túbulos são revestidos com espermatogônias, que estão em diferentes estágios de diferenciação. Essas células desenvolvem-se a partir das células germinativas primordiais por uma longa série de mitoses. O último tipo celular no desenvolvimento é o espermatócito primário, que sofre meiose I para formar dois espermatócitos secundários haploides. Os espermatócitos secundários rapidamente sofrem meiose II, cada um formando duas espermátides, que se diferenciam, sem uma outra divisão, nos espermatozoides. Em humanos, o processo total ocorre em 64 dias. O enorme número de espermatozoides produzidos exige várias centenas de mitoses.<sup>54</sup>

**Ovogênese:** O gameta feminino está programado não apenas para contribuir com a metade do genoma do novo indivíduo, oriundo de uma fertilização, mas também para fornecer o material e a energia necessários para o embrião, até que ele possa obter sua nutrição de uma fonte externa.<sup>52</sup> Ao contrário da espermatogênese, que é iniciada na puberdade e continua na vida adulta, a ovogênese inicia-se antes mesmo do nascimento e termina depois do fim da maturação sexual.<sup>53,54</sup> Os ovócitos se desenvolvem a partir das células germinativas primordiais por uma série de cerca de 20 mitoses. Cada ovogônia é uma célula central em um folículo em desenvolvimento. Por volta do terceiro mês de desenvolvimento pré-natal, as ovogônias do embrião começam a se transformar em ovócitos primários, dos quais alguns entram em prófase da meiose I. Os ovócitos primários completam toda prófase I até o momento do nascimento, e aqueles que não degeneram permanecem nesse estágio por anos, até a ovulação como parte do ciclo menstrual da mulher. Depois que a mulher atingiu a maturidade sexual, os folículos individuais começam a crescer e amadurecem, e poucos (em média um por mês) são ovulados. Agora, antes da ovulação, o ovócito rapidamente completa a meiose I, dividindo-se de forma que uma célula torna-se o ovócito secundário (um ovo ou um óvulo) e a outra se torna o primeiro corpo polar. A meiose II começa prontamente e prossegue para o estágio de metáfase diante da ovulação, onde ela para, somente sendo completada se a fertilização ocorrer.<sup>54</sup>

Perturbações da meiose durante a gametogênese, como por exemplo a não disjunção, resultam na formação de gametas cromossomicamente anormais. Quando envolvidos na fertilização, estes gametas com anormalidades cromossômicas numéricas causam desenvolvimento anormal, tal como ocorre com as crianças portadoras da síndrome de Down.<sup>53</sup>

## Erros na meiose

Já que a meiose é um processo mais complicado do que a mitose, é mais propensa a falhar em algum momento.<sup>55</sup> A maior parte das anormalidades meióticas resulta na infertilidade ou na fertilidade parcial, sendo a última res-



ponsável pelas anormalidades cromossômicas que ocorrem em abortos espontâneos ou em nascidos vivos,<sup>15</sup> porque qualquer alteração no complemento cromossômico que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, comprometendo a fertilização e o subsequente desenvolvimento embrionário.<sup>56-58</sup> Sabe-se que os erros na meiose podem gerar aneuploidias e, inversamente, a falta ou a presença de um cromossomo adicional em um indivíduo aneuploide afeta o processo de meiose.<sup>59</sup>

Nos seres humanos, a maioria das aneuploidias é incompatível com a vida, constituindo-se na maior parte das causas de perda gestacional durante o primeiro trimestre.<sup>60</sup> Mais de 20% das concepções humanas são perdidos devido a erros na meiose. Embora estes possam ocorrer tanto durante a espermatogênese quanto durante a oogênese, a imensa maioria dos humanos aneuploides é causada por erros durante a meiose feminina.<sup>60,61</sup> Na verdade, em comparação com outras espécies, a incidência de erros humanos no sexo feminino é extraordinariamente elevada e, por motivos que permanecem desconhecidos, é fortemente influenciada pela idade.<sup>60</sup>

Speed,<sup>62</sup> em 1988, e Speed e Chandley,<sup>63</sup> em 1990, mostraram em estudos que, se não há pareamento dos homólogos ou do segmento de homólogos, o processo meiótico não continua. No entanto, também pode ocorrer uma severa alteração das células germinativas antes que se produza o aparecimento cromossômico embrionário em indivíduos com as seguintes constituições cromossômicas: 45,X, trissomia autossômica, triploidia, XXY e XYY; além de mutações gênicas e fatores ambientais.<sup>15</sup>

**Não disjunção autossômica:** O termo não disjunção se refere a qualquer processo que leve a somente uma direção dos polos dois cromossomos homólogos que deveriam segregar para polos opostos. A não disjunção cromossômica é uma das causas mais importantes de infertilidade de origem cromossômica.<sup>15</sup> Estes erros ocorrem na meiose I materna e constituem a forma mais importante de não disjunção em humanos, mas não podemos esquecer os erros cromossômicos específicos de origem paterna.<sup>64</sup>

Anormalidades cromossômicas são a forma mais conhecida de morte fetal de todas as espécies, sendo as trissomias dos cromossomos autossômicos 13, 18 e 21 as mais comuns e que trazem larga consequência individual e socioeconômica.<sup>65</sup> Apesar de não conhecermos ao certo o mecanismo da não disjunção nos homens, sabemos que um pré-requisito básico para elucidar os mecanismos da não disjunção é preciso para a determinação da origem parental e do erro na divisão meiótica.<sup>64</sup>

**Não disjunção dos cromossomos sexuais:** Com o advento da análise do polimorfismo de DNA na década de 1980, tornou-se possível determinar as associações dos pais e da fase meiótica envolvidas na origem das condições de aneuploidia em humanos. Esta abordagem tem sido largamente utilizada para o estudo das trissomias autossômicas, destacando uma conclusão: apesar das variações individuais entre os cromossomos, a grande maioria das trissomias autossômicas deriva de uma não disjunção materna, que tipicamente ocorre em meiose I.<sup>61</sup> Surpreendentemente, porém, esta generalização não é extensiva aos cromossomos sexuais. A seguir, as alterações que envolvem cromossomos sexuais serão descritas conforme estudo de Hall e colaboradores<sup>59</sup> de 2006.

- 47,XXX: Ocorre uma predominância materna, com apenas 10% dos casos com erros de origem paterna. Coerente com a maioria das trissomias autossômicas, os erros na meiose I materna são muito mais comuns do que os erros na meiose II.<sup>66</sup>
- 47,XXY: Estudos realizados por Thomas e Hassold<sup>67</sup> mostram um contraste com os estudos de trissomias autossômicas, pois quase 50% dos casos são provenientes de não disjunção paterna na meiose I. Esta é a única fonte paterna possível de casos de 47,XXY, porque erros paternos na meiose II irão gerar gametas XX ou YY.
- 47,XYY: É a única que necessariamente envolve um erro paterno pela presença de um cromossomo Y a mais. Ocorre durante a meiose II paterna ou durante a clivagem precoce, quando erros nas primeiras divisões mitóticas podem produzir um conceito com dois cromossomos Y. Robinson e Jacobs<sup>68</sup> concluíram que a maioria dos

casos estudados foi causada por erros na meiose II paterna e não pela não disjunção pós-zigótica.

- 45,X: Diferentemente das outras aneuploidias de cromossomos sexuais, os indivíduos têm a falta de um cromossomo ao invés da adição de um cromossomo sexual. Isto complica estudos de origem, porque não se sabe por qual motivo os cromossomos não conseguem se separar ou se o cromossomo está ausente no gameta. Portanto, é possível determinar o progenitor, mas não o erro na meiose que dará origem à monossomia X. Em contraste com estudos de trissomias autossômicas, aproximadamente 70 a 80% dos casos de monossomia do cromossomo sexual parecem ser causados pela perda paterna de um cromossomo sexual.<sup>69</sup>

#### **Divisão transversal centromérica:**

Também é conhecida como *misdivisão* ou *fissão* centromérica. Este evento tem origem principalmente na meiose, porém pode ocorrer também durante a mitose. Neste caso, ocorre a divisão de forma transversal do centrômero, separando os braços cromossômicos e não as cromátides-irmãs, como normalmente ocorreria em uma divisão normal.

Duas consequências podem ocorrer para a divisão transversal do centrômero, dependendo da fase em que ela ocorrer:

- Se ocorrer na fase S até a anáfase, quando os cromossomos ainda possuem duas cromátides-irmãs, o erro dá origem aos isocromossomos.
- Se somente uma cromátide for separada transversalmente da anáfase até a fase S, ocorre o aparecimento dos cromossomos teloméricos.<sup>15</sup>

Entretanto, a divisão transversal centromérica ocorre mais frequentemente durante a primeira divisão meiótica, sendo o resultado mais frequente dessa alteração em humanos o isocromossomo de X tanto no braço curto quanto no braço longo.<sup>26,70</sup>

#### **Causas ambientais de não disjunção**

**meiótica:** As causas de não disjunção podem ser ambientais ou genéticas. Experimentos em plantas e animais revelam que uma variedade

de agentes ambientais, tanto físicos quanto químicos, pode levar a erros na meiose. Por exemplo, choques de temperaturas impedem o aparecimento cromossômico e induzem a meiose totalmente anormal em muitos organismos.<sup>15</sup>

Hábitos pessoais incluindo o fumo, o consumo de álcool e drogas ou a exposição a fatores ambientais, tais como radiação, têm sido propostos como possíveis fatores de causa de aneuploidia.<sup>71</sup> No estudo de Sherman e colaboradores,<sup>72</sup> com casos categorizados por estágio de origem (meiose I ou meiose II) e idade materna (< 35 ou ≥ 35 anos), foi observada uma associação significativa entre o hábito do tabagismo e a não disjunção cromossômica nas mulheres mais jovens, com o efeito sendo limitado aos casos na meiose II.

**Idade parental:** Uma das causas da não disjunção nos seres humanos que já está bem estabelecida é a idade materna avançada. Neste caso, os gametas anormais originam-se durante a meiose I. Uma possibilidade óbvia é o modelo do “ovócito velho”: sugeriu-se que, quanto mais antigo o ovócito, maior a chance de os cromossomos não se segregarem corretamente.<sup>73</sup> Outra possível causa de maior frequência de aneuploidia em filhos de mulheres mais velhas (> 35 anos) é a incapacidade de abortar espontaneamente os zigotos anômalos.<sup>74</sup>

Estimativas sugerem que mulheres entre 20 e 24 anos estão envolvidas em aproximadamente 2% das gestações com alguma anormalidade cromossômica no feto.<sup>61</sup> Porém, o mesmo estudo revelou que, em mulheres com idade entre 40 anos ou mais, o valor aumenta para quase um terço das gestações. Durante os últimos anos, estudos têm demonstrado que em humanos, para além da idade materna, a localização de recombinação de eventos influencia a capacidade de homólogos de segregarem-se durante a primeira divisão da meiose.<sup>60,61</sup>

Contudo, não só a idade materna avançada é a responsável pela não disjunção – a idade paterna também deve ser relevante, porém com um efeito bem menor. Uma base adicional para a especulação sobre o efeito da idade paterna é o possível acúmulo das mutações durante repetidas replicações de células-tronco durante a espermatogênese.<sup>73</sup>

## Referências

- Mitchison JM. The biology of the cell cycle. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- Lewin B. Genes IX. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- Sveiczer A, Tyson JJ, Novak B. Modelling the fission yeast cell cycle. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004 Feb;2(4):298-307.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Walter P. Fundamentos de biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- Taylor JH. The replication and organization of DNA in chromosomes. In: Taylor J, editor. *Molecular genetics I*. New York: Academy Press; 1963. p. 65-111.
- Junqueira LCU, Carneiro J. Biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- Borges-Osório MR, Robinson WM. Genética humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- Cross FR. Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Dec;7(6):790-7.
- Burns GW, Bottino PJ. Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
- Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
- Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989 Nov 3;246(4930):603-8.
- Guerra M. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
- Pasternak JJ. Genética molecular humana: mecanismos das doenças hereditárias. Barueri: Manole; 2002.
- Oksala T. Timing relationships in mitosis and meiosis. *Caryologia*. 1954; 6(suppl):272-81.
- Therman E, Susman N. Human chromosomes: structure, behavior. 3rd ed. New York: Springer Verlag; 1996.
- D'Amato F. Polyploidy in cell differentiation. *Caryologia*. 1989; 42(3-4):183-211.
- Levan A, Hauschka TS. Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J Natl Cancer Inst*. 1953 Aug;14(1):1-43.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*. 2001 May 4;105(3):297-306.
- John PC, Qi R. Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends Plant Sci*. 2008 Mar;13(3):121-7.
- Matuszewski B. Transition from polyteny to polyploidy in salivary glands of cecidomyiidae. *Chromosoma*. 1965 Jan 30;16:22-34.
- Pearson MJ. Polyteny and the functional significance of the polytene cell cycle. *J Cell Sci*. 1974 Jul;15(2):457-79.
- Tschermak-Woess E. Notizen über die riesenkerne und „riesenchromosomen“ in den antipoden von *Aconitum*. *Chromosoma* 1956 Jul; 8(1):114-34.
- Nagl W. Polytene chromosomes of plants. *Int Rev Cytol*. 1981;73:21-53.
- Zybina EV, Kudryavtseva MV, Kudryavtsev BN. Polyploidization and endomitosis in giant cells of rabbit trophoblast. *Cell Tissue Res*. 1975 Jul 23;160(4):525-37.
- Oksala T, Therman E. Mitotic abnormalities and cancer. In: German J, editor. *Chromosomes and cancer*. New York: John Wiley & Sons; 1974. p. 239-63.
- Therman E, Sarto GE, Stubblefield PA. Endomitosis: a reappraisal. *Hum Genet*. 1983;63(1):13-8.
- Sarto GE, Stubblefield PA, Therman E. Endomitosis in human trophoblast. *Hum Genet*. 1982;62(3):228-32.
- Therman E, Sarto GE, Kuhn EM. The course of endomitosis in human cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986 Jan 15;19(3-4):301-10.
- Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, et al. Endomitosis of human megakaryocytes is due to abortive mitosis. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3711-23.
- Grant WF. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ Health Perspect*. 1978 Dec;27:37-43.
- Gisselsson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma*. 2008 Dec;117(6):511-9.
- Therman E, Timonen S. Multipolar spindles in human cancer cells. *Hereditas*. 1950 Oct;36(4):393-405.
- Therman E, Kuhn EM. Mitotic modifications and aberrations in cancer. *Crit Rev Oncog*. 1989;1(3):293-305.
- Saunders W. Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Semin Cancer Biol*. 2005 Feb;15(1):25-32.
- Hansemann D. Ueber pathologische Mitosen. *Virchows Archiv*. 1891Feb; 123(2):356-70.
- Steinbeck RG. Imbalance of morphologically addressed telophases reflects interphase DNA aneuploidy in tumorigenesis. *Eur J Histochem*. 1997;41(4):243-54.
- Steinbeck RG. Chromosome division figures reveal genomic instability in tumorigenesis of human colon mucosa. *Br J Cancer*. 1998 Apr;77(7):1027-33.
- McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in zea mays. *Genetics*. 1941 Mar;26(2):234-82.

39. Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM, Saunders WS. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*. 2004 Jun;112(8):389-97.
40. Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res*. 2005 Jan 15;302(2):233-43.
41. Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):215-25.
42. Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):303-8.
43. Shuster MI, Han L, Le Beau MM, Davis E, Sawicki M, Lese CM, et al. A consistent pattern of RIN1 rearrangements in oral squamous cell carcinoma cell lines supports a breakage-fusion-bridge cycle model for 11q13 amplification. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Jun;28(2):153-63.
44. Jin C, Jin Y, Gisselsson D, Wennerberg J, Wah TS, Strömbäck B, et al. Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytogenet Genome Res*. 2006;115(2):99-106.
45. Stewénius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, et al. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 12;102(15):5541-6.
46. Bajer AS, Vantard M. Microtubule dynamics determine chromosome lagging and transport of acentric fragments. *Mutat Res*. 1988 Oct;201(2):271-81.
47. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):300-3.
48. Kanda T, Otter M, Wahl GM. Mitotic segregation of viral and cellular acentric extrachromosomal molecules by chromosome tethering. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):49-58.
49. Golubovskaya IN. Genetic control of meiosis. *Int Rev Cytol*. 1979;58:247-90.
50. Otto PG, Otto PR, Frota-Pessoa O. *Genética humana e clínica*. 2. ed. São Paulo: Roca; 1998.
51. Lopes S. *Bio: volume único*. São Paulo: Saraiva; 2002.
52. Garcia SML, Jeckel EA, Garcia CF. *Embriologia*. Porto Alegre: Artes médicas; 1991.
53. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia básica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
54. Nussbaum RL, McInnes, RR, Willard HF. *Thompson & Thompson: genética médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2008.
55. Chandley AC. Meiosis in man. *Trends Genet*. 1988 Mar;4(3):79-84.
56. Navarro PA, Liu L, Trimarchi JR, Ferriani RA, Keefe DL. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83 Suppl 1:1197-205.
57. Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, et al. Multiparameter analysis of human oocytes at Metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod*. 2003 Jul;18(7):1494-503.
58. Vieira RC, Barcelos ID, Ferreira EM, de Araújo MC, dos Reis RM, Ferriani RA, et al. Evaluation of meiotic abnormalities of oocytes from polycystic ovary syndrome patients submitted to ovarian stimulation. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008 May;30(5):241-7.
59. Hall H, Hunt P, Hassold T. Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Jun;16(3):323-9.
60. Hunt PA. Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. *Biochem Soc Trans*. 2006 Aug;34(Pt 4):574-7.
61. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. 2001 Apr;2(4):280-91.
62. Speed RM. The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes. *Hum Genet*. 1988 Mar;78(3):260-6.
63. Speed RM, Chandley AC. Prophase of meiosis in human spermatocytes analysed by EM microspreading in infertile men and their controls and comparisons with human oocytes. *Hum Genet*. 1990 May;84(6):547-54.
64. Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*. 1998 Feb;13(2):313-9.
65. Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet*. 1984;18:69-97.
66. MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet*. 1994 Aug;3(8):1365-71.
67. Thomas NS, Hassold TJ. Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update*. 2003 Jul-Aug;9(4):309-17.
68. Robinson DO, Jacobs PA. The origin of the extra Y chromosome in males with a 47,XXY karyotype. *Hum Mol Genet*. 1999 Nov;8(12):2205-9.

69. Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, Skuse D. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet.* 1997 Nov;61(Pt 6):471-83.
70. Therman E, Patau K. Abnormal X chromosomes in man: origin, behavior and effects. *Humangenetik.* 1974;25(1):1-16.
71. Frias S, Ramos S, Molina B, del Castillo V, Mayén DG. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutat Res.* 2002 Sep 26;520(1-2):25-37.
72. Sherman SL, Lamb NE, Feingold E. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Biochem Soc Trans.* 2006 Aug;34(Pt 4):578-80.
73. Nakadonari EK, Soares AA. Síndrome de Down: considerações gerais sobre a influência da idade materna avançada. *Arq Mudi.* 2006;10(2):5-9.
74. Lima CP. *Genética humana.* 3. ed. São Paulo: Harbra;1996.

---

## Leituras recomendadas

Qian YW, Erikson E, Maller JL. Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1. *Science.* 1998 Nov 27;282(5394):1701-4.

Strachan T, Read AP. *Genética molecular humana.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.27-53.

Mariana Severiano Dias  
Sharbel Weidner Maluf

# Controle do ciclo celular

## Introdução

Diferentes modelos experimentais utilizando organismos filogeneticamente tão distantes como leveduras, ouriço-do-mar, anfíbios e mamíferos favoreceram os estudos sobre a regulação do ciclo celular<sup>1</sup> e, como dito anteriormente, muitas das proteínas funcionam perfeitamente em humanos. Portanto, podemos tomar como base estes estudos.

O sistema-controle do ciclo celular ativa as enzimas e proteínas responsáveis por um processo no tempo correto e as desativa logo após o término de tal processo. Ele também deve assegurar que cada estágio do ciclo tenha terminado antes de iniciar o próximo: deve haver certeza, por exemplo, que a replicação do DNA foi completada somente uma vez antes do início da mitose, que a mitose tenha terminado antes da divisão da célula em duas e que outro processo de replicação do DNA não ocorra até que a célula tenha sofrido mitose e atingido um tamanho apropriado.<sup>2</sup> Assim, existirá material suficiente para distribuir entre as células-filhas, isso porque a massa celular influencia a habilidade da célula de proceder pelo *start*<sup>3</sup> e o *exit* só ocorrerá quando a célula estiver com os cromossomos corretamente alinhados e se comprometer em terminar o processo de divisão, criando duas novas células que ficarão em  $G_1$ .<sup>4,5</sup>

De qualquer modo, sobrepostos nesta rota estão os pontos de checagem, que avaliam a prontidão das células para procederem no ciclo. Cada ponto de checagem representa uma alça de controle que torna a iniciação de um

evento do ciclo celular dependente do total sucesso de um evento anterior. Muitos pontos de checagem operam na mitose para assegurar que a célula não tentará se dividir até que tenha concluído todos os eventos precedentes necessários. Um importante ponto de checagem estabelece que todo o DNA tenha sido replicado; outros pontos de checagem determinam se há alguma lesão do DNA e adiam a mitose até que o reparo tenha ocorrido. Isto explica por que uma característica comum do ciclo de provavelmente todas as células somáticas eucarióticas é que a completa replicação de DNA representa um pré-requisito para a divisão celular.<sup>3</sup>

As interrupções são importantes também para permitir que o sistema-controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Estes controles ambientais geralmente agem sobre o sistema-controle em um ou outro dos dois importantes pontos de checagem do seu ciclo: em  $G_1$ , exatamente antes de entrar na fase S, e em  $G_2$ , no início da mitose. Em células eucarióticas superiores, sinais que regulam o ciclo comumente agem no ponto de controle de  $G_1$ . Quando as circunstâncias impedem a divisão celular, muitas células entram em repouso neste estágio. Em um ciclo celular contínuo, é no ponto de controle  $G_1$  que o sistema-controle do ciclo celular aciona um processo que iniciará a fase S, e no ponto controle  $G_2$  desencadeará a fase M.<sup>3</sup>

Os primeiros dados sobre a regulação da fase S vieram de estudos em que as células humanas de vários estágios do ciclo celular estavam unidas para formar uma única célula com dois núcleos. Esses experimentos revelaram que, quando uma célula em fase  $G_1$  é fusiona-

da com uma célula em fase S, a replicação do DNA ocorre no núcleo da  $G_1$  (presumivelmente desencadeada pela atividade da S-Cdk na célula em fase S). A fusão de uma célula em fase  $G_2$  com uma célula em fase S, entretanto, não promove síntese de DNA no núcleo da  $G_2$ . Esses estudos forneceram uma clara sugestão de que as células que tiverem completado a fase S são incapazes de replicarem novamente seus DNAs, mesmo quando fornecida uma S-Cdk ativa. Aparentemente, a passagem pela mitose é necessária para a célula recuperar a capacidade de sofrer a fase S.<sup>2</sup>

A ativação da S-Cdk, no final da  $G_1$ , dá a partida e inicia a replicação do DNA. O início da replicação também requer a atividade de uma segunda proteína-quinase, que colabora com a S-Cdk para causar a fosforilação do complexo de reconhecimento de origem (CRO), complexo este que se liga à origem de replicação por todo o ciclo celular e serve como plataforma para várias outras proteínas regulatórias.<sup>2</sup>

A atividade da S-Cdk se mantém alta durante a  $G_2$  e no início da mitose, evitando que re-replicações ocorram após a conclusão da fase S. A M-Cdk também ajuda a assegurar que não ocorram re-replicações durante a mitose, fosforilando as proteínas Cdc6 e Mcm. A  $G_1$ /S-Cdk também ajuda a induzir a exportação da Mcm para fora dos núcleos, certificando que o excesso de proteínas Mcm que não se ligaram nas origens ao final da  $G_1$  seja retirado de ação antes que a replicação inicie. A finalização da replicação do DNA deixa as células  $G_2$  com duas cópias exatas do genoma, no qual cada cromossomo replicado consiste de duas cromátides-irmãs idênticas coladas uma na outra ao longo da sua extensão. A célula, então, sofre um dramático transtorno na fase M, no qual os cromossomos duplicados e outros conteúdos celulares são distribuídos igualmente nas duas células-filhas. Os eventos da mitose são desencadeados pela M-Cdk, que é ativada após a fase S estar completa.<sup>2</sup>

A ativação de M-Cdk inicia com o acúmulo de M-ciclina (ciclina B nas células de vertebrados). No ciclo celular embrionário, a síntese de M-ciclinas é constante durante o ciclo celular, e o acúmulo de M-ciclinas resulta de uma diminuição na sua degradação. A capacidade da M-Cdk de ativar seu próprio ativador

(Wee1) sugere que a ativação da M-Cdk na mitose envolve uma retroalimentação positiva. De acordo com este interessante modelo, a ativação parcial da Cdc25, provavelmente por uma proteína chamada de polo-quinase, conduz à ativação parcial de uma subpopulação de complexos M-Cdk, que fosforilam mais moléculas de Cdc25 e Wee1. Isso leva à maior desfosforilação e à ativação da M-Cdk. Tais mecanismos rapidamente promovem a ativação completa de todos os complexos M-Cdk na célula, convertendo um aumento gradual nos níveis de M-ciclinas em um mecanismo do tipo comutador, com aumento brusco na atividade de M-Cdk.<sup>2</sup>

---

## Proteínas e enzimas envolvidas no controle do ciclo celular

Algumas características do ciclo celular, incluindo o tempo necessário para completar certos eventos, variam muito de um tipo de célula para outro, ainda que no mesmo organismo. A organização básica do ciclo e do sistema de controle é essencialmente a mesma em todas as células eucarióticas. As primeiras proteínas do sistema-controle surgiram há bilhões de anos, tendo sido conservadas ao longo da evolução, tanto que muitas funcionam perfeitamente quando transferidas de uma célula humana para uma levedura. Portanto, o ciclo celular e a sua regulação podem ser estudados em uma grande variedade de organismos, e todo o conhecimento obtido pode ser centralizado em um único modelo de como as células eucarióticas se dividem.<sup>2</sup>

No início dos anos de 1970, foram identificados mutantes de leveduras defectivos de controle do ciclo celular, os quais foram chamados de mutantes cdc (ciclo de divisão celular). No caso, eram dois, um detectado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, denominado *cdc28*, e um em seu homólogo, identificado em *Schizosaccharomyces pombe*, denominado *cdc2*. Eles se detêm tanto no ponto *start* da fase  $G_1$  do ciclo como na transição  $G_2$ /M, indicando que as proteínas *Cdc28* e *Cdc2* são fundamentais para que esses pontos do ciclo sejam transpostos. Muitas dessas mutações levam as células a pararem em um ponto específico do ciclo celular, sugerindo que o pro-

duto normal de um gene é necessário para que ele vá além desse ponto.

Nos anos de 1980, também foram identificadas, em outros tipos celulares, novas proteínas que se acumulam ao longo do período interfásico e são degradadas rapidamente no final da mitose.

## Proteína-quinases dependentes de ciclina (Cdks)

As Cdks são os motores que impulsionam os eventos do ciclo de células eucarióticas e determinam o tempo em que cada um deve ocorrer. No complexo ciclo celular, são também os processadores de informações, garantindo a integração dos sinais extracelular e intracelular, assim como a boa coordenação de eventos do ciclo celular em face da mudança ambiental ou de falha mecânica. Assim, se pretendemos compreender os mecanismos fundamentais de controle do ciclo celular, temos de compreender a estrutura e a regulação das Cdks.<sup>6</sup>

Existem duas famílias de proteínas que são chave para o funcionamento do sistema-controle do ciclo celular (**Figura 4.1**). A primeira é a família das proteína-quinases dependentes de ciclina (Cdk ou Cdc2), as quais induzem processos dependentes pela fosforilação de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. A segunda é uma família de proteínas ativadoras especializadas chamadas de ciclinas, que se ligam às moléculas de Cdk durante a  $G_1$  e controlam sua habilidade de fosforilar proteínas-alvo apropriadas. Essas

proteínas são assim chamadas porque sofrem um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo de divisão celular.<sup>2</sup>

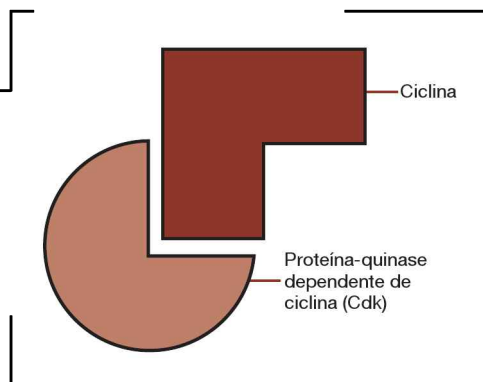
Hoje existem cerca de doze Cdks. A primeira a ser descrita, a Cdk1 (ou Cdc2), foi por muito tempo considerada como a mestra das quinases no ciclo celular, pois acreditava-se que era a responsável por todas as transições do ciclo celular.<sup>7</sup> Isto é válido para leveduras, onde a atividade de Cdk1 é exigida no período de  $G_1/S$  e na transição  $G_2/M$ .<sup>8</sup> No entanto, nas células de mamíferos, a atividade da Cdk1 só é exigida na transição  $G_2/M$ .<sup>9</sup> Entretanto, para a Cdk1 tornar-se ativa ela deve se ligar na ciclina A, B.<sup>10-12</sup>

As subunidades catalíticas da Cdk não agem sozinhas: a sua capacidade de acionar os eventos do ciclo celular é completamente dependente de ciclina e subunidades associadas, cuja oscilação de concentração pode estar sujeita à fase específica da atividade da Cdk. Embora a ciclina seja obrigatória, o principal determinante da função de Cdk são camadas adicionais de subunidades reguladoras, e as proteína-quinases, que também modulam a atividade de Cdk, fazem o reconhecimento do substrato e a localização subcelular. Esta afinada rede regulamenta e assegura que os eventos da mecânica para a duplicação de DNA e da divisão celular ocorram de forma precisa e coordenada.<sup>6</sup>

Essas moléculas de Cdk durante a  $G_1$  são requeridas para o início da fase S.<sup>2</sup> A ciclina não pode ser detectada na célula no início da  $G_1$ , mas sua síntese começa nessa fase e continua ao longo das fases S e  $G_2$ . À medida que ela se acumula, forma um complexo com

**Figura 4.1**

O complexo de ciclina com Cdk age como uma proteína-quinase para desencadear processos dependentes. Sem ciclina, a Cdk é inativa.





Cdk: o fator promotor de maturação (MPF). O complexo, no entanto, permanece inativado até o final da intérfase. A ativação do MPF é responsável pela transição de  $G_2/M$ , uma vez que dá início aos principais eventos da mitose. A forma inicialmente inativa e posteriormente ativada do MPF na intérfase depende, respectivamente, de processos específicos de fosforilação e desfosforilação da sua subunidade Cdk. Quando o complexo é formado, a Cdk está fosforilada em um resíduo de treonina e um de tirosina.<sup>43</sup> Essa dupla fosforilação a mantém inativa e, consequentemente, também o MPF, enquanto ele se acumula durante S e  $G_2$ . Esses dois resíduos são desfosforilados por uma ação de uma fosfatase denominada *Cdc25* e, quando isso ocorre, o dímero MPF se torna ativo e apto para atuar como proteína-quinase, fosforilando várias proteínas-alvo importantes na mitose (**Quadro 4.1**).<sup>4,5</sup>

## Fator promotor de maturação (MPF)

A mitose depende da ativação de uma proteína pré-existente, a quinase de fase M, a qual possui duas subunidades. Uma delas é a subunidade catalítica de quinase, ativada pela modificação no início da fase M. A outra subunidade é uma ciclina, assim denominada porque é acumulada em consequência da síntese contínua durante a intérfase. A síntese de

RNA e de proteínas não histônicas continua (a primeira em menor quantidade). Além disso, ocorre o acúmulo de um complexo proteico citoplasmático, denominado fator promotor de maturação (MPF), que é considerado o regulador geral da transcrição de  $G_2$  para M, induzindo a entrada em mitose e sendo responsável por quatro eventos dessa fase: condensação cromossômica, ruptura do envoltório nuclear, montagem do fuso e degradação da proteína ciclina, que, quando destruída, é responsável pela inativação da quinase M e pela liberação das células-filhas da mitose. A ativação final do MPF é quase explosiva. Acredita-se que isso seja devido a um mecanismo de retroalimentação positiva, em que a concentração de MPF ativo aumenta a atividade das enzimas que ativam o MPF: desta maneira, a concentração de MPF ativo aumenta a uma velocidade acelerada até que um ponto crítico seja alcançado, onde um grande fluxo de MPF ativo desencadeia os eventos dependentes que levam a célula a entrar em mitose. O MPF também é inativado rapidamente pela degradação da ciclina mitótica no limite das fases metáfase-anáfase, permitindo que a célula saia da mitose<sup>2</sup> (**Figura 4.2**).

Os níveis de ciclina são controlados pela proteólise. Sua degradação é resultado do mecanismo ubiquitina-dependente e exige uma pequena sequência perto do N-terminal da ciclina mitótica.<sup>6</sup> A importância da degradação

### QUADRO 4.1

#### Ciclo celular e a fosforilação e desfosforilação de proteínas

A fosforilação (catalisada por quinases) e a desfosforilação (catalisada por fosfatases) são eventos críticos que regulam o ciclo celular. Ambas são utilizadas para controlar as atividades do próprio circuito regulador e para controlar a atividade dos substratos que executam as decisões do circuito regulador, que consiste de uma série de quinases e fosfatases que respondem a sinais externos e pontos de checagem, fosforilando ou desfosforilando o próximo membro da rota. O objetivo final do circuito é determinar a atividade da quinase de fase M (ou da quinase de fase S) pelo controle de seu estado de fosforilação.

A ativação da quinase M é o evento que desencadeia o estabelecimento da fase M. A inativação é necessária para a saída da fase M, sugerindo que os eventos regulados pela quinase de fase M são reversíveis, isso porque a fosforilação de substratos é necessária para o retorno da organização apresentada na intérfase.

Pelo fato de o MPF induzir a entrada da célula em mitose, a quinase de fase M desencadeia suas atividades direta ou indiretamente. Ela pode ser um “regulador-mestre”, que fosforila proteínas-alvo que, por sua vez, atuam na regulação de outras funções necessárias; ou ela pode ser um “cavalo de força” que, por ação própria, fosforila substratos necessários para executar os eventos reguladores ou a reorganização celular envolvidos no ciclo.<sup>2</sup>

da ciclina é mais evidente no controle da saída da mitose, onde a destruição das ciclinas mitóticas é necessária para o início da telófase, bem como para os preparativos para o próximo ciclo celular<sup>14</sup> (**Figura 4.3**).

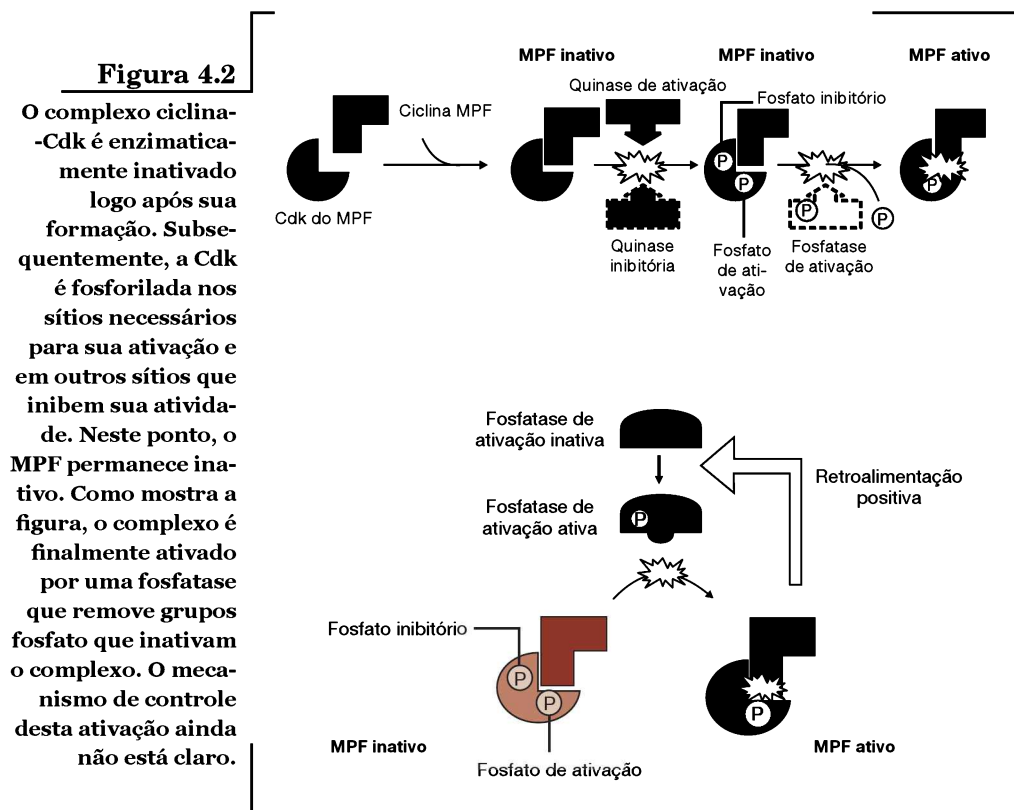
Duas ubiquitina-ligasas são importantes na destruição das ciclinas e de outros reguladores do ciclo celular. Nas fases  $G_1$  e S, um complexo de enzimas denominado *SCF* (iniciais das suas três principais subunidades proteicas) é responsável pela ubiquitinação e pela destruição das  $G_1/S$ -ciclinas e de certas proteínas CKI (proteínas inibidoras de Cdk) que controlam o início da fase S. Na fase M, o complexo promotor da anáfase (APC) é responsável pela ubiquitinação e pela proteólise da M-ciclina e de outras reguladoras da mitose. Esses dois grandes complexos de multissubunidades contêm alguns componentes relacionados, mas são regulados de diferentes maneiras. A atividade da SCF é constante durante o ciclo celular. A ubiquitinação da SCF é controlada por mudanças no estado de fosforilação das proteínas-alvo: somente as proteí-

nas especificamente fosforiladas são reconhecidas, ubiquitinizadas e destruídas (**Figura 4.4**). A atividade da APC, ao contrário, muda nos diferentes estágios do ciclo celular. A APC é acionada principalmente pela adição de subunidades ativadoras no complexo.<sup>2</sup>

## Polo-quinases (Plks)

As Plks são parte de uma família de ciclo celular independente de proteína-quinases-ciclina. Polo, o protótipo enzima, foi inicialmente identificada em *Drosophila* como um gene do ciclo celular com uma função essencial durante  $G_2$ -M.<sup>15</sup> Alelos mutantes do gene polo são responsáveis pela formação de fusos mitóticos monopolares e multipolares e também pela segregação anormal de cromossomos.<sup>16</sup>

A quinase é composta de um catalisador e um domínio PBD (*Polo Box Domain*), que deve ligar a uma proteína previamente fosforilada por uma quinase primária para permitir a ativação da Plk1.<sup>17</sup> Além disso, a Plk1 é ativa-



da pela fosforilação da sua *T-loop* ativada por uma quinase. A Plk1 está localizada nos centrossomos, nos cinetócoros e no fuso central (*midbody*) durante a mitose, desempenhando vários papéis durante a mitose, participando da transição da fase  $G_2/M$  e inibindo ou atrasando a entrada da célula na mitose.<sup>12</sup>

A atividade de Plk1 também é necessária para a maturação dos centrossomos, recrutando proteínas necessárias para os microtúbulos que participaram da montagem do fuso bipolar, pela fosforilação dessa quinase que vai interagir com várias proteínas envolvidas na dinâmica dos microtúbulos.<sup>18,19</sup>

A exata função da Plk1 nos cinetócoros e a sua participação na checagem do fuso continuam a ser esclarecidas. A Plk1 também é necessária para ativar a E3 ubiquitina-ligase APC/C responsável por acionar a degradação proteica na mitose. Embora a Plk1 fosforile diretamente as subunidades APC/C, seu efeito sobre a atividade APC/C é menor<sup>20</sup> quando comparado à fosforilação por Cdk1/ciclina B1.<sup>21</sup>

Finalmente, provas da função da Plk1 na citocinese têm sido encontradas em diversos organismos.<sup>12</sup> A formação do septo é prejudicada na cisão de leveduras quando as quinases são defeituosas/mutantes, enquanto septos ectópicos são formados quando a quinase é

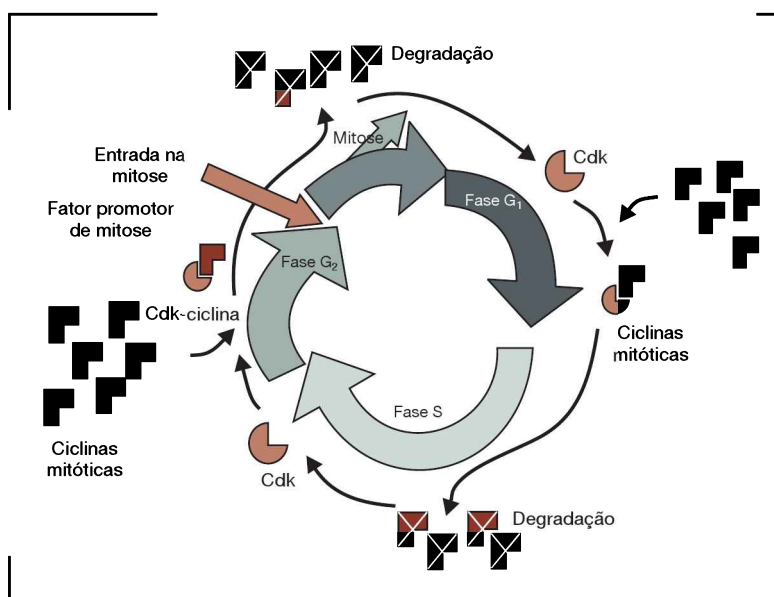
superexpressada.<sup>22,23</sup> Em *Drosophila*, polo-quinase mutante também mostra defeitos na citocinese em diversos estágios da espermatogênese.<sup>24</sup> Já em células de vertebrados, a quinase se localiza no fuso central.<sup>25</sup>

Já foi demonstrado anteriormente que o estado estacionário da Plk e níveis proteicos são coordenadamente regulados, havendo um crescimento constante a partir de uma baixa em  $G_1$  para um pico durante  $G_2-M$ .<sup>26,27</sup>

## Aurora-quinases

As aurora-quinases foram primeiramente identificadas em *S. cerevisiae* e *Drosophila*.<sup>28,29</sup> Células de leveduras possuem apenas uma aurora-quinase, invertebrados como *Drosophila* e *C. elegans* têm duas (tipos A e B), e os mamíferos têm três (tipos A, B e C).<sup>30</sup> De um ponto de vista evolutivo, os tipos A e B têm evoluído a partir de um ancestral comum, enquanto o tipo C tem evoluído a partir do tipo B.<sup>31</sup> Consequentemente, a aurora A tem funções distintas, enquanto as auroras B e C apresentam as mesmas partes funcionais. Ainda com suas diferenças, todas as três quinases estão envolvidas no controle de muitos processos necessários de mitose.<sup>12</sup>

Aurora-quinases são proteínas nucleares com diferentes localizações subcelulares. A



**Figura 4.3**

As proteína-quinases dependentes de ciclina (Cdks) se associam com várias ciclinas nas diferentes etapas do ciclo celular, formando um complexo Cdk-ciclina. A ativação deste complexo induz processos que conduzem a célula através de distintas fases do ciclo. A degradação das ciclinas inativa o complexo.

aurora A está sempre associada aos centrosomos e, em determinada etapa, se dispersa para os microtúbulos até sair da mitose.<sup>32</sup> Bischoff e colaboradores,<sup>33</sup> utilizando imunofluorescência indireta com anticorpos aurora A, encontraram a localização da aurora A em centrosomos, fusos polares e fusos da prófase e da metáfase, mas predominantemente foi encontrada junto ao fuso durante telófase das células do timo, dos testículos e do fígado fetal, além de ter baixa expressão na medula óssea, nos linfonodos e no baço. A aurora A pode ser degradada quando a mitose ocorre tardiamente ou se a fase  $G_1$  for precoce.<sup>34</sup> A aurora B é uma quinase que também é um passageiro cromossômico típico. Ela começa a acumular-se em  $G_2$ . Na prófase, quando os cromossomos se condensam, ela encontra-se nos seus braços. Na metáfase, a localização da aurora B começa a ficar confinada aos cinetócoros, e na anáfase abandona os cinetócoros e fica no fuso central (*midbody*), enquanto há a migração das cromátides para os polos para que a citocinese ocorra.<sup>35</sup> Podemos observar sua expressão mais elevada e em nível normal no timo e no fígado fetal.<sup>33</sup> A aurora C exibe funções similares àquelas atribuídas à aurora B, sendo necessária para a citocinese.<sup>36</sup> Por isso, a aurora C pode ser uma quinase tão importante como outras quinases na regulação de vários eventos mitóticos, estando localizada nos centrosomos da anáfase na citocine-

se<sup>37</sup> e sendo predominantemente expressa nos testículos.<sup>38</sup>

## Apoptose

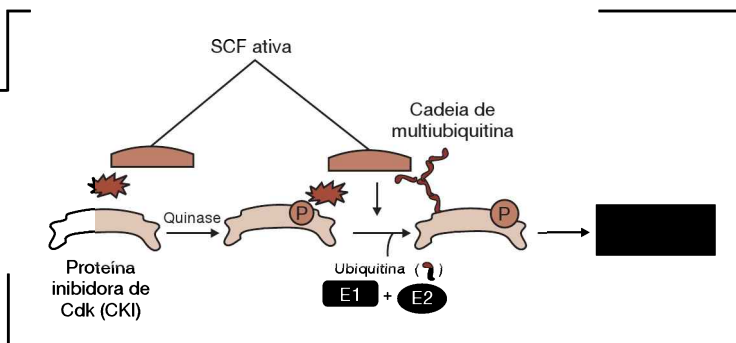
Durante o desenvolvimento de um organismo eucarioto multicelular, algumas células são destinadas a morrer. As células indesejadas são eliminadas durante a embriogênese, a metamorfose e a renovação tissular. Esse processo é chamado de morte celular programada, ou apoptose (do grego *apo* = a partir de, *ptose* = queda), oferecendo um controle crucial sobre o número total de células.<sup>3</sup>

O controle apropriado da apoptose é crucial em provavelmente todos os eucariotos superiores, pois a morte celular equilibra exatamente a divisão celular. Se isso não acontecesse, o tecido poderia crescer ou encolher ou, ainda, as falhas na apoptose poderiam permitir que células tumorigênicas sobrevivessem, contribuindo, portanto, para o câncer. A ativação inapropriada da apoptose está envolvida em doenças neurodegenerativas.

As células que morrem devido a uma lesão aguda tipicamente incham e arrebentam. Elas expelem seus conteúdos sobre todas as células vizinhas em um processo chamado de necrose celular, provocando uma resposta inflamatória potencialmente prejudicial (**Tabela 4.1**).

**Figura 4.4**

A fosforilação de uma proteína-alvo, tal como a CKI mostrada, permite que a proteína seja conhecida pela SCF, a qual é constitutivamente ativa. Com a ajuda de duas proteínas denominadas E1 e E2, a SCF age como uma ubiquitina-ligase que transfere múltiplas moléculas de ubiquitina para a proteína CKI. A proteína CKI ubiquitinada é imediatamente reconhecida e degradada em um proteossomo.



**TABELA 4.1**  
*Comparação entre os aspectos morfológicos e fisiológicos da necrose e da apoptose*

Características	Necrose	Apoptose
Tamanho celular	Aumentado (edema)	Reduzido (encolhe)
Núcleo	Picnose; cariólise	Fragmentação em partículas do tamanho de lisossomos
Membrana plasmática	Danificada	Intacta; estrutura alterada (orientação dos lipídeos)
Conteúdo celular	Digestão enzimática; pode extravasar para fora da célula	Intacto; pode ser liberado (corpos apoptóticos)
Inflamação adjacente	Frequente	Ausência
Papel fisiológico ou patológico	Sempre patológica (parte final da lesão celular irreversível)	Geralmente fisiológica (eliminação celular); patológica (lesão no DNA)

Em contraste, uma célula que sofre apoptose morre de forma ordenada, sem prejudicar as células vizinhas. As mudanças morfológicas que ocorrem durante o processo incluem a fragmentação do DNA, resultante de clivagens entre os nucleossomos, a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear em pequenos núcleos, o que dá à célula um aspecto granuloso. Quando a fosfatidilserina fica exposta na superfície da célula, ela adquire a função de mandar um sinal de “comam-me” para os macrófagos, que podem mediar efetivamente a liberação dos corpos apoptóticos.<sup>39</sup> Este tipo de morte celular, portanto, é sugerido para não desencadear inflamação.

A apoptose é uma forma bem regulada de morte celular, que pode ser iniciada por dois diferentes tipos de sinais: sinais de estresse intracelulares e ligantes extracelulares. Sinais intracelulares de estresse, tais como retirada do fator de crescimento, danos no DNA, estresse oxidativo, ou oncogene ativação, levam à permeabilização da membrana externa da mitocôndria. A consequente liberação de citocromo *c* e de outras proteínas pró-apoptóticas propaga o sinal apoptótico.<sup>40,41</sup>

A apoptose pode ser desencadeada por uma série de estímulos, incluindo remoção de fatores essenciais de crescimento, tratamento com glicocorticoides, irradiação  $\gamma$  e ativação de certos receptores específicos, denominados receptores de morte. (Figura 4.5).<sup>1,3</sup> Outro meio de iniciar a apoptose é utilizado no sistema imune, onde linfócitos T citotóxicos<sup>2</sup> matam as células-alvo por um processo que en-

volve a liberação de grânulos contendo serina-proteases e outros componentes líticos. Um destes componentes é a perforina, que pode fazer buracos na membrana da célula-alvo.<sup>3</sup> A habilidade da proteína supressora de tumor p53 de desencadear a apoptose é uma importante defesa contra o câncer. A apoptose é importante, portanto, não somente no desenvolvimento dos tecidos, mas na defesa imune na eliminação de células cancerosas.<sup>40</sup>

A ativação da rota responsável pela apoptose depende de uma família de proteases que apresenta uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspártico específico, denominadas caspases. Elas são sintetizadas na célula com um precursor inativo, ou procaspases, o qual normalmente é ativado pela clivagem do ácido aspártico por outras caspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam e então ativam outras procaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica.<sup>2,40</sup> Algumas clivam a lâmina nuclear, por exemplo, causando a quebra irreversível da lâmina; outras clivam uma proteína que normalmente mantém a enzima degradadora do DNA no núcleo da célula. Assim, a célula se desmancha rápida e ordenadamente, e seu cadáver é rapidamente tomado e digerido por outras células.<sup>2</sup>

A ativação da via da morte intracelular, como a entrada em um novo estágio do ciclo celular, normalmente é desencadeada por um modelo totalmente “tudo-ou-nada”. A cascata de protease não é somente destrutiva e auto-estimulada, mas também irreversível; uma



vez que a célula tenha avançado até um ponto crítico ao longo da via de destruição, ela não pode voltar atrás.<sup>2</sup>

Um princípio geral da ativação é desencadeado por proteínas adaptadoras que fazem com que múltiplas cópias de procaspases específicas, conhecidas como procaspases iniciadoras, se unam firmemente, em um complexo ou agregado. Elas são dotadas de uma pequena atividade de protease e, quando são forçadas a entrar no complexo, sua proximidade faz com que uma clive a outra, desencadeando sua mútua ativação. Quando a caspase do topo da cascata está ativada, ela cliva a próxima procaspase para estimular o sinal de morte, que se estende por toda a célula.

A ativação da procaspase pode ser desencadeada de fora da célula por uma ativação de receptores de morte ou receptor Fas, na superfície da célula. Um anticorpo direcionado contra a proteína Fas mata as células que a expressam em sua superfície. A razão é que a reação anticorpo-Fas ativa a Fas, o que desencadeia uma rota para a apoptose.<sup>3</sup> O agrupamento de proteína Fas recruta os adaptadores de proteínas intracelulares que se ligam e agregam moléculas procaspase-8, que clivam e ativam uma à outra. As moléculas caspase-8 ativadas vão ativar as próximas procaspases, para induzirem a apoptose.<sup>2</sup>

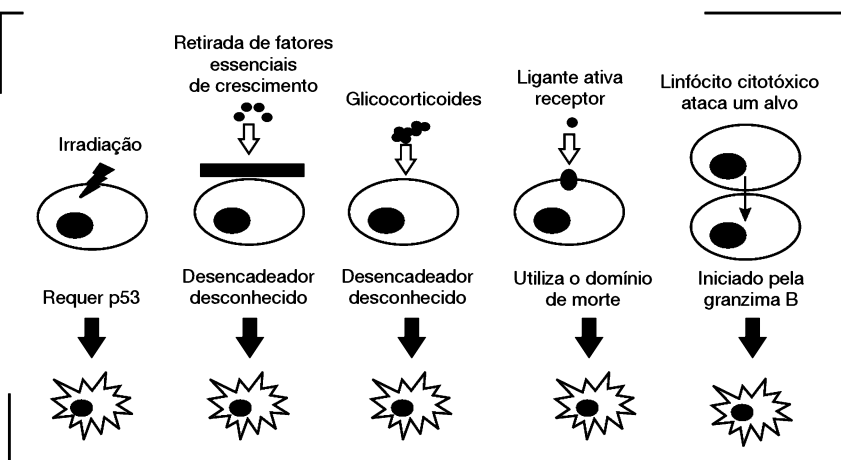
No caso do processo melhor compreendido, as mitocôndrias são induzidas a liberar a proteína carreadora de elétrons citocromo c para dentro do citosol, onde ela liga e ati-

va uma proteína adaptadora denominada *Apaf-1*. A liberação do citocromo c da mitocôndria é promovida pela família de proteínas chamada de *Bcl-2*, que ajudam a regular a ativação das procaspases. Alguns membros dessa família, como a própria *Bcl-2* ou a *Bcl-X<sub>L</sub>*, inibem a apoptose, pelo menos parcialmente, ao bloquearem a liberação do citocromo c da mitocôndria. Outros membros da família *Bcl-2* não são inibidores da morte – em vez disso, promovem a ativação das procaspases e a morte celular. Algumas dessas promotoras da apoptose, tal como a *Bad*, funcionam por ligação e inativação da família dos membros inibidores da morte, enquanto outras, como a *Bax* e a *Bak*, estimulam a liberação do citocromo c da mitocôndria. Se os genes que codificam a *Bax* e a *Bak* são inativados, as células são notavelmente resistentes a muitos estímulos indutores da apoptose, indicando a importância crucial dessas proteínas na indução da apoptose.<sup>2</sup> A apoptose envolve a localização (ou talvez o aumento da concentração) de membros da família *Bcl-2* na membrana mitocondrial, incluindo *Bid* (necessário para a liberação de citocromo c) e *Bax* (talvez envolvido nas mudanças de permeabilidade da membrana).<sup>3</sup>

Outra importante família de reguladores intracelulares da apoptose é a família IAP (proteínas inibidoras da apoptose). Estas proteínas inibem a apoptose por duas vias: elas se ligam a algumas procaspases para evitar sua ativação, e ligam-se a caspases inibindo sua atividade. As IAPs foram originalmente descobertas como proteínas produzidas por certos

**Figura 4.5**

**A variedade de rotas que podem desencadear a apoptose.**



vírus de insetos, que as usam para evitar que a célula infectada morra antes que o vírus tenha tempo de replicar-se. Quando a mitocôndria libera o citocromo *c* para ativar a *Apaf-1*, eles também liberam uma proteína que bloqueia as IAPs, aumentando em muito a eficiência do processo de ativação da morte.<sup>2</sup>

O programa de morte celular intracelular também é regulado por sinais extracelulares, que podem ativar ou inibir a apoptose. Esses sinais moleculares atuam principalmente re-

gulando os níveis ou a atividade dos membros das famílias *Bcl-2* e IAP.<sup>2</sup>

A existência de mecanismos para inibir, assim como para ativar, a apoptose sugere que muitas (ou até mesmo todas) células possuem uma capacidade intrínseca para a apoptose. Se os componentes da rota são onipresentes, o determinante crítico que decide se uma célula deve viver ou morrer pode depender dos mecanismos reguladores que definem se a rota deve ser ativada ou reprimida.<sup>3</sup>

## Referências

1. Junqueira LCU, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
2. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Walter P. *Fundamentos de biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
3. Lewin, Benjamin. *Genes IX*. Porto Alegre: Artmed, 2009.
4. Sullivan M, Morgan DO. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Nov;8(11):894-903.
5. Tyson JJ, Novak B. Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol*. 2008 Sep 9;18(17):R759-R768.
6. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91.
7. Fisher DL, Nurse P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J*. 1996 Feb 15;15(4):850-60.
8. Durkacz B, Carr A, Nurse P. Transcription of the *cdc2* cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*. 1986 Feb;5(2):369-73.
9. Draetta G, Beach D. Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell*. 1988 Jul 1;54(1):17-26.
10. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):829-38.
11. Karaïskou A, Perez LH, Ferby I, Ozon R, Jessus C, Nebreda AR. Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):36028-34.
12. Salaun P, Rannou Y, Prigent C, Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol*. 2008;617:41-56.
13. Sveiczer A, Tyson JJ, Novak B. Modelling the fission yeast cell cycle. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004 Feb;2(4):298-307.
14. King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1652-9.
15. Sunkel CE, Glover DM. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci*. 1988 Jan;89 ( Pt 1):25-38.
16. Uchiumi T, Longo DL, Ferris DK. Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9166-74.
17. Elia AE, Rellos P, Haire LF, Chao JW, Ivins FJ, Hoepker K, et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell*. 2003 Oct 3;115(1):83-95.
18. Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol*. 1996 Dec;135(6 Pt 2):1701-13.
19. do Carmo Avides M, Tavares A, Glover DM. Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):421-4.
20. Golan A, Yudkovsky Y, Hershko A. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15552-7.
21. Kraft C, Herzog F, Gieffers C, Mechtler K, Hagting A, Pines J, Peters JM. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J*. 2003 Dec 15;22(24):6598-609.

22. Ohkura H, Hagan IM, Glover DM. The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* 1995 May 1;9(9):1059-73.
23. Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang Y, Pringle JR, et al. Role of polo kinase and Midp in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol.* 1998 Dec 14;143(6):1603-16.
24. Carmena M, Riparbelli MG, Minestrini G, Tavares AM, Adams R, Callaini G, et al. *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol.* 1998 Nov 2;143(3):659-71.
25. Qian YW, Erikson E, Maller JL. Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo like kinase *Plx1*. *Mol Cell Biol.* 1999 Dec;19(12):8625-32.
26. Hamanaka R, Smith MR, O'Connor PM, Maloid S, Mihalic K, Spivak JL, et al. Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J Biol Chem.* 1995 Sep 8;270(36):21086-91.
27. Lee KS, Yuan YL, Kuriyama R, Erikson RL. Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol Cell Biol.* 1995 Dec;15(12):7143-51.
28. Chan CS, Botstein D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics.* 1993 Nov;135(3):677-91.
29. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell.* 1995 Apr 7;81(1):95-105.
30. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):21-32.
31. Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol.* 2004 Oct 12;4(1):39.
32. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Nov;4(11):842-54.
33. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 1998 Jun 1;17(11):3052-65.
34. Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajdich M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008 Jun;152(1):27-33.
35. Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC, Carmena M. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.* 2001 May 14;153(4):865-80.
36. Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, et al. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):47201-11.
37. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):7334-40.
38. Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics.* 1998 Nov 1;53(3):406-9.
39. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000 May 4;405(6782):85-90.
40. Borensztajn KS, Spek CA. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36(3-4):137-47.
41. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev.* 2008 Dec;34(8):737-49.



# Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética

## Introdução

Vários tipos de tecidos humanos podem ser usados para a preparação dos cromossomos e posterior análise do cariótipo. A escolha do tecido depende do tipo de paciente (pré ou pós-natal), do propósito do diagnóstico (constitucional ou adquirido) e da indicação clínica. No diagnóstico pré-natal, as células fetais são utilizadas para o diagnóstico constitucional do complemento cromossômico do feto. Os tecidos mais utilizados para este propósito são as células do líquido amniótico (LA), que são os amniócitos; as vilosidades coriônicas (material placentário) e os linfócitos de sangue fetal (do cordão umbilical), nesta ordem de preferência. Além disso, a escolha do tipo de tecido e do procedimento a ser realizado depende de alguns fatores como a idade gestacional, ou se o diagnóstico citogenético é de importância primária ou secundária para outros testes genéticos (moleculares ou bioquímicos). Outros tecidos fetais, como placenta, pele, pulmão, líquido ascítico ou renal, também podem ser utilizados para a avaliação citogenética em casos de indicação terapêutica ou término da gestação.<sup>1</sup> Para pacientes neonatos ou adultos, o tecido mais comumente utilizado para o diagnóstico cromossômico constitucional é o sangue periférico. Embora em uma frequência bem menor, pode-se utilizar nestes pacientes a biópsia de pele ou de ovários, dependendo da indicação. Para as anormalidades cromossômicas adquiridas, frequentemente associadas a neoplasias, utiliza-se a medula óssea ou, em casos de tumores sólidos, biópsias do próprio tumor.

A maioria dos tecidos utilizados para o diagnóstico citogenético não possui um número significativo de mitoses espontâneas, sendo quase sempre necessária uma cultura de células para a preparação dos cromossomos. Consequentemente, as técnicas de cultura de tecidos têm se transformado em parte integrante e fundamental da pesquisa cromossômica. O conceito básico da cultura de tecidos tem permanecido inalterado durante anos. Entretanto, algumas variações nas condições das culturas e no meio apropriado para cada uma delas têm sido adotadas para uma maior e mais rápida proliferação celular, bem como para a obtenção de maior quantidade de células mitóticas e melhor resolução (morfologia) dos cromossomos.<sup>2</sup>

## As bases da cultura de tecidos

Qualquer que seja o tecido utilizado para preparação cromossômica, este deve crescer em uma cultura. Os linfócitos de sangue periférico, de cordão ou de medula crescem flutuando livres no meio de cultura, sem aderirem a nenhuma superfície. São as chamadas “culturas em suspensão”, que normalmente são de curta duração, ou seja, algumas horas (em geral, entre 48 e 72 horas). Por outro lado, as células epiteliais, os fibroblastos, os amniócitos ou as células de tumores sólidos se aderem a uma superfície (do frasco) e dependem dela para se multiplicar. São as chamadas “culturas de camada única”, que são de longa duração, ou seja, levam dias (de 10 a 15) para se aderirem e se multiplicarem, até tornarem-se confluentes, como mostra a **Figura 5.1**.

A assepsia durante todo o trabalho com cultura de células é fundamental, desde a obtenção do material a ser cultivado até a coleta das células. A relevância deste item durante todo o processo merece ser sempre ressaltada, pois é fundamental para a obtenção de qualquer resultado. A assepsia inicia na coleta do material, sendo a pessoa responsável por esta etapa devidamente treinada neste sentido. O ambiente de coleta, o frasco, a seringa e o meio de cultura onde o material será depositado também devem ser devidamente esterilizados.

## Regras básicas para o manuseio e o sucesso do cultivo celular

- *Meio de cultura adequado* – Para cada tipo de amostra, o meio deve ter os nutrientes específicos. Isto será discutido em cada item.
- *Ambiente apropriado para o trabalho* (sala fechada e fluxo laminar) – O ideal é possuir uma sala específica para uso exclusivo da cultura celular. Esta sala deve ser permanentemente desinfetada, inclusive as paredes, o teto e as janelas. Caso não seja possível uma sala única para a cultura, pelo menos deve ser deixado um canto do laboratório geral para a colocação do fluxo laminar, onde não haja muito trânsito de pessoas. Todo o manuseio do material

deve ser dentro da capela de fluxo laminar (vertical), que sempre deve ser desinfetada com álcool isopropílico 70%, antes e depois de sua utilização. Esta capela deve possuir uma lâmpada UV, que é germicida, que deve permanecer ligada sempre quando não há utilização da capela.

- *Produtos estéreis descartáveis* – Estes produtos são frascos, tubos e pipetas que, de preferência, não devem ser de vidro para evitar contaminação pela lavagem inadequada, ou intoxicação das células por utilização de detergentes tóxicos a elas.
- *Estufa de CO<sub>2</sub>* – O CO<sub>2</sub> é necessário para manutenção do pH e consequente crescimento mais rápido das células, mas apenas nas culturas abertas. As culturas fechadas, como no caso de sangue periférico, não necessitam desta estufa – pode ser uma estufa bacteriológica comum, desde que regulada a 37°C, temperatura comum a todas as culturas.

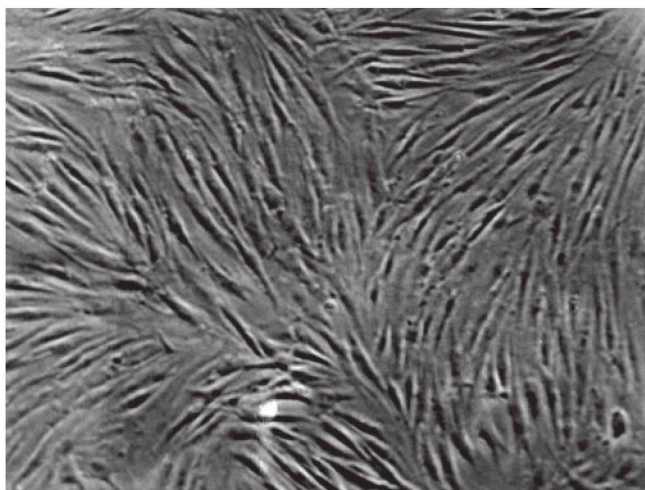
## Os diferentes tipos de cultura de tecidos

### 1. Sangue periférico

O sangue é o tecido mais utilizado para o diagnóstico citogenético, devido à grande variedade de casos clínicos que podem ser elucidados com o cariótipo, bem como pela simpli-

**Figura 5.1**

**Fibroblastos em cultura confluenta.**



cidade de seu cultivo. No caso do sangue periférico, também devido à facilidade de obtenção tanto em neonatos, como em crianças e adultos. A coleta sempre deve ser realizada com uma seringa estéril, heparinizada e descartável. No caso de adultos, devem ser coletados em torno de 10 mL; esse volume deve ser bem menor para crianças (em torno de 5 mL), sendo menor ainda para neonatos ou o cordão umbilical (1 a 2 mL). O sangue de cordão umbilical é coletado por um obstetra experiente, depois da vigésima semana de gestação, com o auxílio do ultrassom. A indicação para esta coleta pode ser a ausência de líquido amniótico (material mais apropriado para detecção de anormalidades cromossômicas), devido a alguma malformação fetal detectada mais tardiamente na gestação e que tenha suspeita de cromossomopatia, ou mesmo para confirmação de um cariótipo duvidoso em líquido amniótico.

Tanto o sangue periférico como o de cordão umbilical são processados da mesma maneira. Para o lançamento na cultura, pingam-se de 8 a 10 gotas de sangue total em 5 mL de meio de cultura (dentro da capela de fluxo laminar devidamente asséptica), deixado a 37°C na estufa, em cultura fechada ou aberta, por 72 horas.

## MEIO DE CULTURA

O meio ideal é o RPMI 1.640, que pode vir completo, já diluído ou em pó. Este último, depois de diluído com água purificada, deve ser filtrado com um filtro de 0,22 µ, tornando-se estéril.

Para cada 100 mL de meio RPMI 1.640, devemos adicionar (caso não venha pronto em um kit):

- 20 mL de soro bovino fetal (SBF)
- 1,5 mL de penicilina e estreptomicina (10.000 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente)
- 1,5 mL de L-glutamina (200 mM ou 29,2 mg/mL)
- 2,0 mL de fitoemaglutinina (PHA). Este produto, quando liofilizado, pode permanecer por vários meses no freezer. Contudo, no momento em que é diluído, deve ser utilizado, no máximo em algumas semanas.

O ideal é aliquotar o meio descrito anteriormente em frascos de 5 mL, onde as gotas de sangue poderão ser pingadas diretamente no frasco, e aí permanecerão durante todo seu cultivo.

As culturas de sangue exigem poucos cuidados, podendo permanecer intocadas durante os três dias de cultivo. Alguns laboratórios preferem dar uma homogeneizada uma ou duas vezes ao dia nos frascos para ressuspender as células. Nas culturas fechadas, o meio não se altera, mas naquelas que ficam em uma estufa de CO<sub>2</sub>, o meio pode acidificar demais (podemos ver por sua coloração). Então, é importante abrir um pouco mais a tampa do frasco (ou tubo) para que o gás entre, equilibrando o pH.

## COLETA DAS CÉLULAS

Passadas 72 horas de cultivo, é adicionado 0,1 mL de colchicina (ou Colcemid GIBCO), concentração final de 10 µg/mL, por 35 a 40 minutos em cada cultura. Esta substância impede a formação do fuso acromático, estagnando as divisões celulares na metáfase, etapa esta onde os cromossomos estão mais individualizados e condensados, sendo mais apropriada para a análise do cariótipo. Depois do tempo da colchicina, toda a cultura (sangue+meio de cultura) é transferida para um tubo cônico, quando então será iniciado o processo de coleta e fixação das células. A seguir, os passos:

1. Centrifugar por oito minutos a 1.500 rpm.
2. Retirar o sobrenadante.
3. Adicionar 7 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M, pH 6,8) pré-aquecida a 37°C. Adicionar aos poucos e deixar em banho-maria, a 37°C, por 15 a 20 minutos.
4. Interromper o choque hipotônico com 0,5 mL de fixador Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1).
5. Centrifugar novamente por oito minutos a 1.500 rpm.
6. Retirar o sobrenadante.
7. Repetir os passos 5 e 6.
8. Depois de retirar o último sobrenadante, adicionar 5 mL de fixador Carnoy e colocar no freezer por no mínimo duas horas, melhor *overnight*.

## PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Antes de preparar as lâminas propriamente ditas, o material que havia ficado no freezer deve ser lavado três vezes com fixador Carnoy (centrifugando e retirando o sobrenadante), até que se possa obter uma coloração límpida e quase transparente.

Para a preparação das lâminas, devemos adequar previamente o ambiente. Isto significa tentar obter um ambiente com uma temperatura e umidade estabelecidas para a realização desta etapa. O ideal é ter uma sala especial para isto, mas se pode adaptar o ambiente dentro da própria capela de fluxo laminar. Alguns laboratórios preferem a umidade ao calor, mas o mais indicado é uma temperatura em torno dos 35°C com umidade de 22 a 25%. Após a última lavada do material, retiramos o sobrenadante, deixando um *pellet* suficiente para poder pingar de 2 a 3 gotas em, no mínimo, duas lâminas, e deixando secar a temperatura ambiente. Muita atenção ao identificar as lâminas, pois elas são específicas para cada paciente. Elas devem ser colocadas em uma cubeta de vidro para que passem a noite em uma estufa a 60°C. Este período é necessário para que as lâminas “envelheçam”, tornando melhor a resolução das bandas dos cromossomos. No outro dia, as lâminas são coradas. Em caso de urgência, pode-se deixar as lâminas por 30 minutos a 180°C.

## COLORAÇÃO E BANDEAMENTO

Uma solução de tripsina EDTA deve ser preparada (diluir 0,15 mg de tripsina em 100 mL de PBS). Esta solução pode ser preparada anteriormente, aliquotada (em frascos de 20 mL) e armazenada no freezer, sendo retirada para aquecimento apenas no momento do bandejamento. Neste momento, ela deve ser aquecida até 37°C. Deve-se submergir as lâminas, uma a uma, em três soluções diferentes: a primeira contém a tripsina que estava aquecida (deixar a lâmina em torno de 15 a 20 segundos), a segunda contém PBS com SBF (algumas gotas de SBF são suficientes para interromper a ação da tripsina), e a terceira contém apenas PBS, para lavagem das lâminas. Depois disto, elas são coradas com corante Giemsa, diluído com água destilada (20%),

de 3 a 5 minutos. Deve-se corar apenas uma lâmina de cada caso e observá-la ao microscópio para ver como ficou a coloração e o bandejamento, e adequar o tempo do corante e da tripsina conforme for necessário.

## ANÁLISE AO MICROSCÓPIO

A análise ao microscópio é a etapa final e mais minuciosa. Este trabalho deve ser realizado por uma pessoa devidamente treinada, pois o diagnóstico depende exclusivamente da experiência do profissional. São analisadas de 15 a 20 metáfases, as duas melhores são fotografadas e os cromossomos são pareados através do cariotipador automático (computador), apenas para registro, pois o diagnóstico já foi realizado pelo olho humano.

## 2. Medula óssea

Com o estabelecimento da relação entre malignidade e alterações cromossômicas, os estudos citogenéticos têm desenvolvido um importante papel para um número significativo de doenças hematológicas. Estes estudos citogenéticos ajudam no diagnóstico, no prognóstico e na terapia das diferentes leucemias. A medula óssea é o tecido mais utilizado para este fim.

Embora este tecido possa oferecer uma cultura de curta duração (apenas 24 horas), uma vez que as células estão em contínua proliferação, ele possui algumas desvantagens: baixo índice mitótico e uma morfologia de baixa qualidade dos cromossomos, pois eles tendem a ser mais condensados e curtos, o que dificulta a análise. Para tentar amenizar estas desvantagens, protocolos com sincronização das culturas vêm ao encontro de dois objetivos principais: aumentar o índice mitótico com cromossomos mais alongados e melhorar sua morfologia. Normalmente, os laboratórios usam mais de um protocolo para garantir o sucesso dos casos.

### Protocolo 1. Cultura direta

#### Soluções

RPMI 1.640	100 mL
Soro bovino fetal	25 mL
Penicilina e estreptomicina	1,0 mL
L-glutamina	1,0 mL

## Procedimento

1. Obter 1 a 2 mL de medula em uma seringa heparinizada
2. Adicionar 5 a 10 gotas de medula em 5 mL de meio pré-aquecido em um tubo cônico de 15 mL e suspender as células.
3. Centrifugar a suspensão por oito minutos a 800 rpm. Retirar o sobrenadante e ressuspender as células. Repetir a centrifugação e finalmente suspender as células em 5 mL de meio de cultura (lavar bem as células melhora a qualidade da preparação dos cromossomos).
4. Expor as células à colchicina, hipotonia e fixação, seguindo o protocolo de coloração (bandeamento GTG) de sangue periférico.

## Protocolo 2. Cultura de curta duração (24 a 48 horas)

### Soluções

Meio de cultura específico para medula óssea (Marrow Max – GIBCO). Não há necessidade de acrescentar nada mais, o meio vem pronto para uso.

### Procedimento

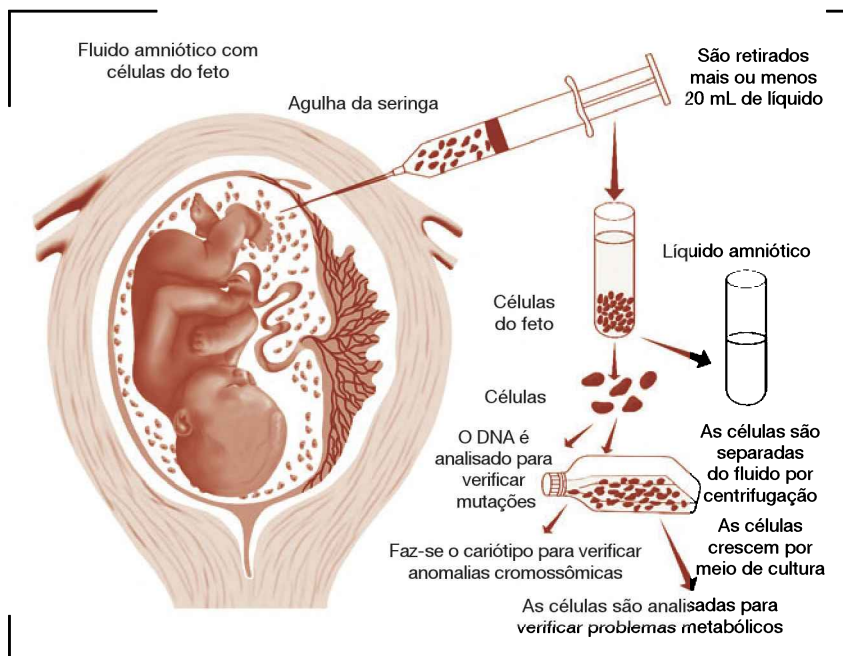
1. Pingar aproximadamente 1 a 2 mL de medula em um tubo cônico com meio especial

para medula (Marrow Max) previamente aquecido.

2. Suspender as células e colocar na estufa por 24 ou 48 horas (melhor fazer os dois tempos de cultivo para ampliar a possibilidade de acerto na resolução dos cromossomos).
3. Depois deste período, acrescentar 0,1 mL de colchicina por 40 a 50 minutos.
4. Centrifugar a 800 rpm por oito minutos.
5. Retirar o sobrenadante, seguindo a hipotonia (KCl), fixação (no mínimo duas lavagens com fixador) e coloração com bandeamento GTG.

## 3. Líquido amniótico

A amniocentese é a retirada de líquido amniótico (LA) da gestante através de uma agulha, sendo guiada por ultrassonografia para diversas análises da condição fetal. Este procedimento pode ser realizado com segurança a partir da 15ª semana de gestação e tem um risco de abortamento de 0,5 a 1%.<sup>3</sup> Com as células fetais que estão flutuando neste líquido, podem ser realizadas análises bioquímicas, moleculares ou cromossômicas (Figura 5.2).



**Figura 5.2**

**Coleta e cultivo de líquido amniótico.**

Para a análise do cariótipo fetal, são retirados 20 mL de LA, divididos em duas seringas. O material é transportado ao laboratório nas próprias seringas, a temperatura ambiente. Ao chegar ao laboratório, o líquido é transferido para dois tubos cônicos (10 mL em cada um), que são centrifugados a 1.500 rpm, durante oito minutos. O sobrenadante é retirado e guardado no freezer para uma eventual necessidade de alguma análise posterior. Ao *pellet* de cada tubo cônico são adicionados 4 mL de meio de cultura, Amniomax Complete (GIBCO), e colocados em um frasco de cultura ventilado (com abertura na tampa), pois irão para a estufa de CO<sub>2</sub>. Quando o obstetra é mais cuidadoso, os primeiros 5 mL são coletados em uma seringa separada e devidamente identificada para que seja lançada em um frasco isolado, sem centrifugar, apenas com meio de cultura, pois nele pode haver contaminação materna. Resumindo, irão para a estufa três frascos: dois frascos com meio de cultura e as células que foram centrifugadas e um frasco com o LA da primeira seringa SEM centrifugar, este último com apenas 2 mL de meio de cultura. Na estufa, estas culturas permanecem até atingirem a confluência adequada para a posterior análise. Porém, diariamente, os frascos são examinados ao microscópio invertido para que se possa ter um acompanhamento da aderência ao fundo do frasco e do crescimento celular. Duas vezes por semana, o meio é trocado, sendo novamente adicionados 4 mL de meio em cada frasco. Após aproximadamente oito dias, as células devem atingir a confluência necessária para serem coletadas.

#### COLETA DAS CÉLULAS

Da mesma maneira que o sangue e a medula, o primeiro passo do processo é adicionar às culturas 0,1 mL de colchicina. As culturas com colchicina ficam durante 30 a 40 minutos na estufa. Como as células estão aderidas na superfície do frasco de cultura, para poder coletá-las devemos primeiro soltá-las do fundo. Isto se faz através da tripsina, que dissolve o *mátrix* celular e faz com que as células se desprendam e fiquem flutuando no meio.

Como proceder: primeiro, retiramos todo o meio do frasco e o colocamos em um tubo

cônico. Adicionamos 0,5 mL de tripsina (previamente aquecida a 37°C) para lavar o que ainda restou de meio. Descartamos no mesmo tubo. Adicionamos mais 1,5 mL de tripsina e deixamos por 40 a 45 segundos na estufa para soltar as células. Observamos ao microscópio invertido para ver se as células soltaram. Algumas células que porventura ainda ficarem aderidas poderão ser soltas com a ajuda mecânica da pipeta Pasteur ou por algumas batidas do frasco na bancada. A tripsina e as células são recolhidas com uma pipeta e transferidas para o mesmo tubo cônico inicial. Este tubo será centrifugado por oito minutos a 1.500 rpm. As células ficam no fundo e o sobrenadante é descartado.

O restante do procedimento, ou seja, hipotonia, fixação, preparação de lâminas e coloração, é semelhante ao do sangue.

A análise ao microscópio deve ser bem acurada, e um maior número de metáfases (e 20 a 30) é analisado para maior segurança.

#### CULTIVO *IN SITU*

Outra maneira de se cultivar o LA é *in situ*, ou seja, o material cresce no próprio local onde será realizada a análise, que é sob uma lamínula colocada dentro de uma placa de Petri. O *pellet* do LA, depois de centrifugado, é colocado gentilmente sob uma lamínula com 2 mL de meio Amniomax, mas apenas sob a lamínula. As células irão sedimentar no fundo da lamínula, aderir e se multiplicar apenas neste local. Depois de quatro dias, devem ser adicionados mais 2 mL de meio de cultura à placa de Petri. Caso seja necessário, é trocado o meio de cultura de toda a placa de Petri (total de 4 mL) passados 6 a 7 dias, quando então as células já estarão aderidas na lamínula.

O processo de hipotonia e fixação das células é o mesmo do LA descrito anteriormente, porém se faz todo o procedimento na própria placa de Petri, que contém a lamínula.

Para fazer as lâminas, retira-se gentilmente a lamínula da placa de Petri, depois da etapa da fixação, com o auxílio de uma pinça, colocando-a sob uma lâmina e colando-a com uma gota de Entellan. Cora-se da mesma maneira descrita no procedimento anterior.



#### 4. Biópsia de vilosidades coriônicas (BVC)

A técnica de BVC tem demonstrado ser tão segura e acurada quanto a amniocentese, podendo ser realizada mais precocemente, entre 12 a 14 semanas de gestação.<sup>4</sup> Este procedimento requer muita habilidade do médico que irá realizá-lo, pois a coleta é mais complexa e envolve um maior risco de perda fetal (de 1 a 1,5%). Retira-se, com uma agulha especial, aproximadamente 10 mg de vilosidades coriônicas (placenta), por via transabdominal e com o auxílio da ultrassonografia. As vilosidades são, na verdade, parte do trofoblasto e refletem o material genético do feto, sendo, portanto, apropriadas para a análise do cariótipo fetal.

As vilosidades são coletadas com meio de cultura (RPMI 1.640, ou HAM F-10, ou Amniomax) já inserido na própria agulha. É aconselhável lavar previamente as paredes da seringa com heparina, para evitar os coágulos que podem prejudicar a visualização do material. A etapa de separação (dissecação) das vilosidades é fundamental. Deve-se separar todo tecido que parece decídua, ou material materno, e coágulos que possam estar na área. Isto pode ser realizado com um bisturi e uma

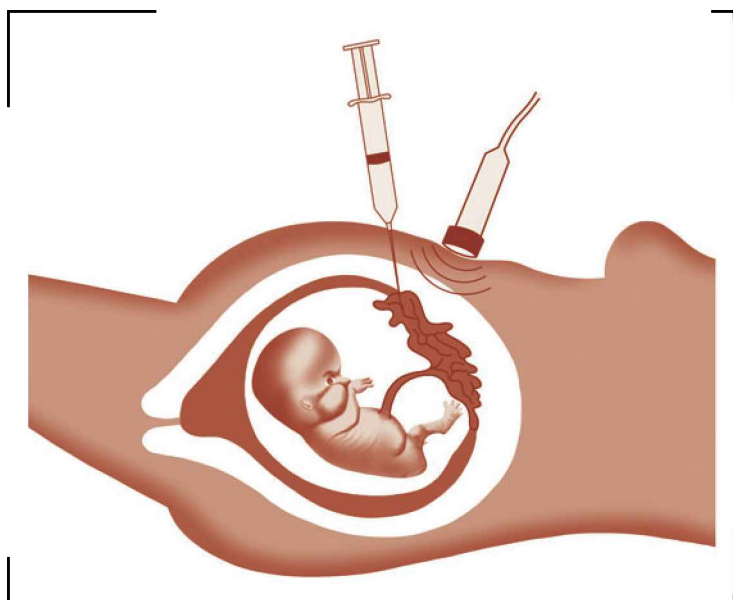
agulha de insulina. A lavagem das vilosidades é realizada com qualquer meio de cultura ou até NaCl. Deve ser cultivado apenas material fetal. As vilosidades são formações esbranquiçadas e ramificadas que ficam ao redor da placenta, parecendo pequenas árvores brancas (**Figura 5.3**).

É importante salientar que a dissecação das vilosidades deve ser realizada sob microscópio invertido, de preferência dentro da capela de fluxo laminar e de maneira estéril.

Depois de separadas e limpas, as vilosidades podem (e devem) passar por dois processos:

**A. Direto:** As metáfases são obtidas diretamente de células do trofoblasto que estão se dividindo espontaneamente. Imediatamente após a coleta e a dissecação das vilosidades, deve-se separar 3 ou 4 vilos e transferi-los para uma placa de Petri contendo 3 mL de meio de cultura (Amniomax). A esta placa é adicionado 0,1 mL de colchicina (concentração final de 10 µg/mL), mantendo-a por 2 a 3 horas na estufa de CO<sub>2</sub>, tempo suficiente de atingir um bom número de metáfases.

**ATENÇÃO:** Todo o procedimento é realizado na própria placa de Petri que contém as vilosidades.



**Figura 5.3**

**Coleta de vilosidades coriônicas.**

- Passado o tempo da colchicina, descartar o meio e adicionar 3 mL de solução hipotônica (citrato de sódio a 1%) pré-aquecida a 37°C. Deixar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar o hipotônico e acrescentar 2 mL de fixador Carnoy. Deixar por 10 minutos.
- Retirar o fixador e acrescentar novo fixador por tempo indeterminado (no mínimo duas horas) até fazer as lâminas.

### PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Esta etapa é determinante e requer muito cuidado.

- Retirar o fixador.
- Fazer a desidratação das vilosidades, passando cada uma por quatro etapas (solução de metanol 100%, 70%, 50% e água destilada), deixando de 10 a 15 segundos em cada solução.

Com uma pinça, pegar uma vilosidade e colocar em uma lâmina seca e pré-aquecida em uma placa quente a 60°C. Pingar nesta lâmina ácido acético 60% (para soltar as metáfases do núcleo) até a vilosidade ficar translúcida. Passar suavemente a pipeta Pasteur na vilosidade, espalhando as metáfases. Repetir isto na placa quente.

### COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

Para fazer a coloração, as lâminas devem estar envelhecidas (*overnight* na estufa de 60°C). Utilizar o mesmo corante Giemsa e bandeamento GTG (tripsina), como nos outros tecidos.

### ANÁLISE DAS LÂMINAS

Como a qualidade das metáfases deste método não é muito boa, deve-se esperar a análise do cultivo de longa duração para encerrar o caso. Contar tantas metáfases quanto for possível.

**B. Cultura de longa duração:** Depois da limpeza e dissecação das vilosidades, elas são transferidas para o centro de uma placa de

Petri seca e estéril, sem meio de cultura. Uma vez no centro da placa e com o auxílio de um bisturi, as vilosidades são picadas (explantes) e a elas se adiciona uma gota de meio de cultura Amniomax. Transfere-se todo este “guisado” para um frasco com tampa ventilada, e espalha-se o material picado em pequenos pedaços por toda a superfície do frasco com o auxílio de uma seringa de insulina. Dependendo da quantidade de vilosidades que foram coletadas, prepara-se um ou dois frascos.

Os frascos vão para a estufa de CO<sub>2</sub> e lá permanecem em posição vertical durante uma hora para que os pequenos pedaços possam se aderir no fundo do frasco. Adicionam-se, então, 3 mL de meio de cultura Amniomax, quando o frasco é virado para a posição horizontal. Depois de três dias, adiciona-se mais 1 mL à cultura. Acompanha-se o crescimento celular diariamente ao microscópio invertido. As células irão começar a crescer ao redor de cada explante, e depois, aos poucos, irão se espalhar pelo frasco. Quando a cultura atinge a confluência e o crescimento desejados, começa o processo de coleta das células.

### COLETA DAS CÉLULAS

O procedimento é similar ao do LA. Adiciona-se à cultura 0,1 mL de colchicina durante 40 minutos e, em seguida, é retirado o meio de cultura, sendo o frasco lavado com tripsina. A mesma tripsina é adicionada para levantar as células do fundo do frasco. Junta-se tudo com uma pipeta Pasteur e se coloca em um tubo cônico.

O processo de hipotonia, fixação, preparação das lâminas e coloração igual ao do LA, porém deve-se cuidar o tempo na tripsina e no corante Giemsa, uma vez que são tecidos diferentes.

## 5. Biópsia de pele (pulmão ou ovário)

Em algumas situações, é importante o cariótipo de pele, por exemplo, quando o paciente foi transfundido ou quando o médico quer confirmar o resultado do sangue periférico. Às vezes, também, a clínica é muito sugestiva de síndrome de Turner, e não aparece nenhuma



(ou poucas) célula 45,X. Nestes casos, a pele pode ajudar a elucidar o diagnóstico.<sup>5</sup> Em outras situações, como amenorreia primária ou ovários em fita (com cariótipo de sangue periférico normal), o ginecologista faz uma biópsia de ovário para pesquisar se existe outra linhagem celular no órgão, sugestiva da síndrome.

A coleta deve ser realizada de maneira totalmente estéril, limpando bem o local da mesma, normalmente no antebraço (punho), e pode ser realizada com uma tesoura ou *punch*. Um pequeno pedaço de pele extraído (1 cm de diâmetro) é suficiente para lançar dois frascos. Pica-se, com lâmina de bisturi, pedaços menores ainda (explantes), sendo distribuídos no frasco com uma agulha de insulina. Adicionam-se 3 mL de meio (Ham F-10 ou Amniomax), e os frascos são deixados na vertical por uma hora para melhor aderência da pele no fundo do frasco. Passado este tempo, o frasco é colocado na horizontal, permanecendo assim por vários dias até a cultura se tornar confluenta. Enquanto isto, o meio é trocado duas vezes por semana, observando o crescimento celular diariamente ao microscópio invertido.

Muitas vezes um feto polimalformado morre sem diagnóstico. Porém, pela história

familiar ou gestacional, ou pela análise do anatomopatológico, há indicação de cromossomopatia. Nestes casos, coleta-se um pedaço do pulmão do feto morto e semeia-se uma cultura muito semelhante ao cultivo de pele e ovário, cortando pequenos explantes que serão colocados no meio de cultura por alguns dias na estufa de CO<sub>2</sub>.

## COLETA DAS CÉLULAS

Quando as células atingem o crescimento desejado, é realizado o mesmo procedimento do LA. Adiciona-se à cultura 0,1 mL de colchicina durante 40 minutos e, em seguida, retira-se o meio de cultura, lavando com tripsina. A mesma tripsina é adicionada para levantar as células do fundo do frasco, juntando tudo com uma pipeta Pasteur e colocando em um tubo cônico. Centrifuga-se e retira-se o sobrenadante. Com o *pellet*, realiza-se o mesmo procedimento do LA: hipotonia, fixação, preparação das lâminas e coloração. Entretanto, deve-se cuidar o tempo na tripsina e no corante Giemsa, uma vez que são tecidos diferentes. Para isto, primeiramente faz-se um teste em apenas uma lâmina para depois corar as outras.

## Referências

1. Kessler RG, Sanseverino MTV, Leistner-Segal S, Magalhães JAA, Giugliani R. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities: report of an 18-year experience in a brazilian public hospital. *Genet Mol Biol*. 2008 Sept-Oct; 31(4):829-33.
2. Verma RS, Babu A. Human chromosomes: principles and techniques. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1995.
3. Magalhães JAA, Magalhães OA. Medicina fetal. In: Freitas FM, Martins-Costa SHA, Ramos JGL, Magalhães JAA. Rotinas em obstetria. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001. p.46-57.
4. Brambati B, Tului L, Cislighi C, Alberti E. First 10,000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat Diagn*. 1998 Mar;18(3):255-66.
5. Battin J. Turner syndrome and mosaicism. *Bull Acad Natl Med*. 2003;187(2):359-67.

Jaqueline Andrades de Miranda  
Margarete Suñé Mattevi

# Técnicas de bandeamento e coloração cromossômica

## Introdução

Até os anos de 1970, os cromossomos humanos eram corados uniformemente com corantes que tinham afinidades por cromatina, como, por exemplo, a orceína e o Giemsa. Com este tipo de coloração, somente as aneuploidias podiam ser caracterizadas. As aberrações estruturais dificilmente eram distinguidas, ou eram impossíveis de serem detectadas, sendo também impossível identificar cada elemento do par cromossômico<sup>1</sup> ou até mesmo o próprio par.

Com o intuito de solucionar estas dificuldades, várias técnicas de bandeamento e coloração foram desenvolvidas e aprimoradas. Estas técnicas podem ser divididas em duas categorias:

- Aquelas que produzem bandas ou faixas ao longo de toda a extensão do cromossomo (bandas Q, G, R).
- Aquelas que marcam regiões específicas de alguns cromossomos ou de todos os cromossomos (bandas C, RON, T, G-11, Cd e coloração DAPI/DA).

## Técnicas que produzem bandas ao longo de todo o cromossomo

Estas técnicas permitem a identificação exata de cada elemento do par cromossômico, além da detecção das aberrações estruturais, possibilitando a análise de todo o cariótipo humano.

A eficiência destas técnicas depende da condensação dos cromossomos. Os cromossomos em metáfase são os mais rotineiramente analisados. Porém, por estarem muito condensados, produzem poucas bandas largas, oferecendo uma informação limitada quando a anormalidade cromossômica é muito pequena. Cromossomos menos condensados permitem a visualização, em média, de 400 bandas. Metáfases com uma resolução moderada e bem bandeadas usualmente produzem em torno de 500 a 550 bandas.<sup>1</sup> Novos métodos de cultura foram desenvolvidos (técnicas de sincronização celular e alongamento químico) para a obtenção de cromossomos menos condensados e mais longos, isto é, cromossomos em prófase ou prometáfase. Nestas fases do ciclo celular, estes cromossomos apresentam um número maior de bandas (por volta de 850). Esta técnica é chamada de bandeamento de alta resolução. A nomenclatura citogenética tem como base estes números aproximados de bandas presentes por conjunto haploide de cromossomos.

## Bandeamento Q

O bandeamento Q foi o primeiro método de marcação longitudinal desenvolvido para cromossomos humanos. As bandas são obtidas pelo tratamento com corantes fluorescentes (fluorocromos). O primeiro fluorocromo a ser usado foi a quinacrina mostarda (*QFQ technique: Q-bands by fluorescence using quinacrine*),<sup>2</sup> que possui maior afinidade por sequências de DNA ricas em AT (banda brilhante). Este bandeamento produz algumas marcações específicas, tais como um polimor-

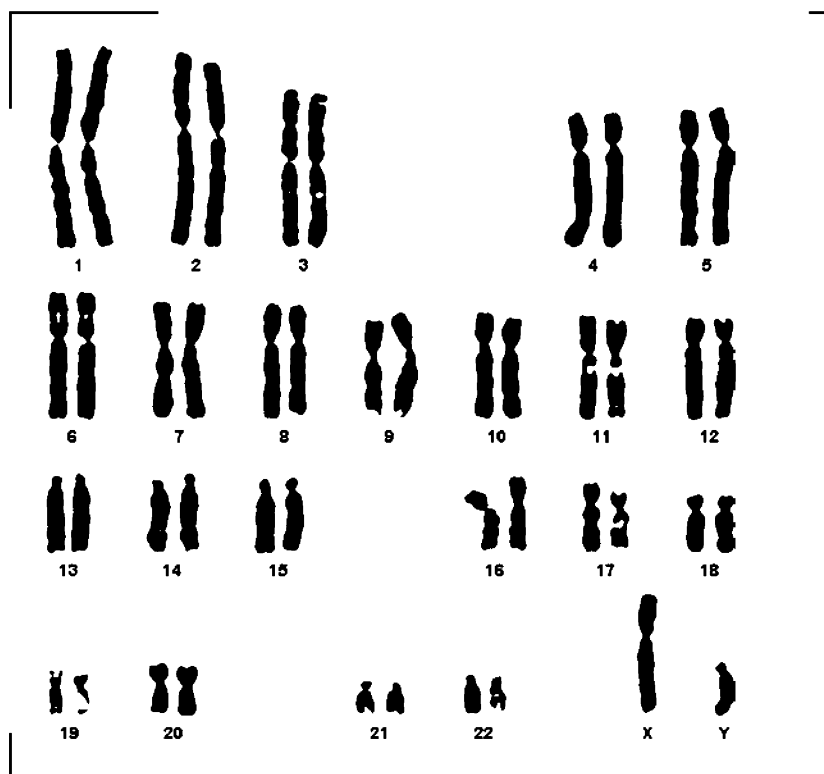
fismo da intensidade de fluorescência na região pericentromérica dos cromossomos 1, 3, 4 e 16 e na região pericentromérica e satélite dos acrocêntricos. Observa-se também uma intensa marcação fluorescente na porção distal do braço longo do cromossomo Y – esta marcação é bem mais intensa do que a do resto do complemento, tanto que pode ser vista em núcleos interfásicos (o que é uma importante vantagem desta técnica). Portanto, o bandejamento Q é útil para estudar os polimorfismos citados anteriormente e/ou detectar a presença de material genético do cromossomo Y. Algumas desvantagens deste método de bandejamento são que a fluorescência da maioria dos fluorocromos não é permanente, exigindo que a preparação e a observação das lâminas sejam feitas em ambiente escuro, além da necessidade do uso de um microscópio de fluorescência, cujo custo é bem maior. Portanto, este método não é viável como rotina na maioria dos laboratórios.

Posteriormente, outros fluorocromos foram usados na obtenção das bandas, como

por exemplo, Hoechst 33258 e DAPI, também com afinidades por regiões ricas em AT, e cromomicina A3, mitramicina e olivomicina, que se ligam em sequências de DNA ricas em bases GC.

## Bandeamento G

O bandejamento G é o método de diferenciação longitudinal dos cromossomos mais usado rotineiramente nos laboratórios de citogenética. O protocolo mais difundido é o que usa a enzima tripsina no tratamento das lâminas e a coloração com Giemsa (*GTG banding: G-bands by trypsin using giemsa*).<sup>2</sup> Este bandejamento produz bandas escuras e claras, permitindo a identificação de cada par cromossômico (**Figura 6.1**). As bandas escuras possuem regiões ricas em bases AT, replicação tardia e poucos genes ativos. Já as bandas claras apresentam sequências ricas em GC, replicação precoce e muitos genes ativos, sendo, portanto, biologicamente mais importantes. Este padrão de bandejamento é



**Figura 6.1**

Cariótipo masculino com bandejamento G (Imagem cedida pelo Laboratório de Citogenética, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

similar ao produzido pelo bandejamento Q. As grandes vantagens desta técnica são o custo razoavelmente baixo e a durabilidade das bandas nas preparações citológicas, possibilitando uma análise apurada das metáfases ao microscópio. Atualmente, existem técnicas de bandejamento G que utilizam outros corantes, tais como Wright ou Leishman.

## Bandeamento R

As bandas reversas possuem um padrão de marcação cromossômica oposto ao produzido pelas bandas Q e G. Elas podem ser produzidas pelo tratamento das lâminas em altas temperaturas em vários tampões, seguido pela coloração com acridina laranja (*RFA banding: R-bands by fluorescence using acridine orange*) ou com Giemsa (*RHG banding: R-bands by heat using Giemsa*).<sup>3</sup> Desta forma, as bandas fluorescentes e escuras possuem maior afinidade por regiões ricas em bases CG, e as bandas opacas e claras, por sequências ricas em bases AT. Ao contrário do bandejamento G, são as bandas R positivas que possuem uma maior quantidade de genes ativos. A grande vantagem desta técnica é que as extremidades dos cromossomos que possuem banda G negativa, e por isto, são de difícil visualização ficam coradas em escuro ou com fluorescência no bandejamento R. Na grande maioria dos laboratórios, as bandas R são usadas como um procedimento suplementar, mas em alguns laboratórios o método é usado como procedimento-padrão, no lugar das bandas G.

Existem outros métodos para a obtenção de bandas R, nos quais os cromossomos são corados com outros fluorocromos, tais como cromomicina A3 ou olivomicina.

## Técnicas que marcam regiões específicas do cromossomo

O DNA dos cromossomos humanos possui diferentes composições que podem ser especificamente coradas. O número de métodos que coram estas regiões tem aumentado enormemente. Este rápido avanço nas técnicas de coloração tem permitido aos pesquisadores determinar ou investigar a estrutura primária

destas bandas específicas. Este conhecimento possibilita, também, o entendimento do papel da heterocromatina na organização do genoma humano. Estas técnicas são usadas em situações particulares da citogenética clínica, especialmente quando as técnicas rotineiras de bandejamento longitudinal não são informativas.<sup>1</sup>

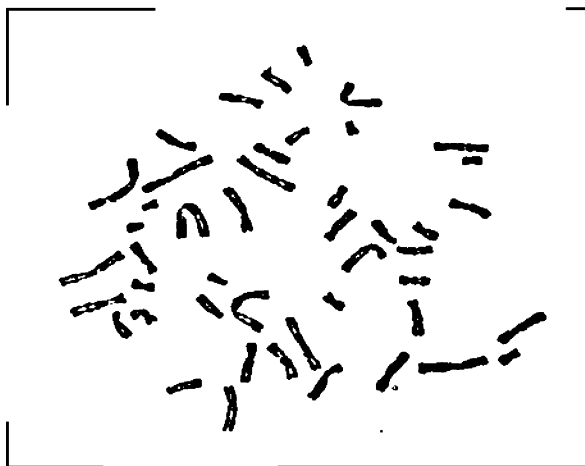
## Bandeamento C

O bandejamento C cora especificamente a heterocromatina constitutiva (HC), que fica localizada, preferencialmente, ao redor dos centrômeros. Em particular, no cariótipo humano, também marca regiões polimórficas pericentroméricas dos cromossomos 1, 9 e 16 e a porção distal do braço longo do cromossomo Y (os cromossomos 1, 16 e Y mostram um padrão de bandas semelhante ao bandejamento Q). Com o bandejamento CBG (*C-bands using barium hydroxide and Giemsa*),<sup>2</sup> o DNA é desnaturado por hidróxido de bário ou álcalis. Ao renaturar (na presença de soluções salinas mornas) a dupla fita, no local em que o DNA é repetitivo, ele o faz muito mais rapidamente, produzindo a banda. Estas marcações escuras possuem DNA repetitivo e de replicação tardia, sendo formadas principalmente por DNA  $\alpha$ -satélite.

O bandejamento C é útil para detectar a presença de cromossomos dicêntricos ou pseudodicêntricos, para estudar cromossomos marcadores (que identificam a linhagem do doador em caso de transplantes de medula, em alguns cânceres) e variantes polimórficas.<sup>1</sup> Especificamente nos cromossomos do grupo C do cariótipo humano, o bandejamento C serve para distinguir os pares 8 e 9, que possuem forma, tamanho e padrões de bandas G parecidos (**Figura 6.2**).

## Bandeamento RON

Esta técnica cora as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), que estão localizadas na constrição secundária dos cromossomos humanos com satélites (Grupos D e G). Estas regiões contêm sítios de DNA moderadamente repetitivo, com sequências de genes ribossômicos. As proteínas existentes nas RONs, que estavam em atividade no ciclo celular anterior,

**Figura 6.2**

Célula em metáfase com a técnica de coloração de bandas C (cedida por Riegel, M. Medical Genetics Institute, Universität Zürich).

têm afinidade por prata. Desta forma, um dos protocolos que pode ser usado é submeter as lâminas a um tratamento com nitrato de prata. Este método é chamado de *Ag-NOR-banding*. Posteriormente, esta técnica foi melhorada, aplicando-se algumas gotas de uma solução coloidal feita com gelatina e ácido fórmico na lâmina antes da impregnação com prata. Pode ser necessário, ou não, corar com Giemsa. Este protocolo é o mais usado atualmente. No total, podem aparecer 10 marcações por metáfase, mas como nem todas RONS entraram em atividade, este número pode variar entre 5 e 10 marcações (**Figura 6.3**).

Outra maneira de obter esta marcação é submeter o material citológico a duas soluções ácidas (ácido tricloroacético 5% e ácido clorídrico 0,1 N) e corar com Giemsa (*N-banding*). Com este método, é possível detectar a localização de todas as RONS presentes nos 10 cromossomos acrocêntricos do cariótipo humano, pois o que cora são as proteínas nucleolares.<sup>3</sup>

Este bandejamento é útil na identificação de cromossomos marcadores e na detecção de rearranjos ou polimorfismos envolvendo cromossomos acrocêntricos. Uma aplicação bem importante é identificar a origem parental e o estágio da não disjunção meiótica nas trissomias que envolvam os cromossomos acrocêntricos humanos.

## Bandeamento T

As bandas T (*telomere banding*) representam um subconjunto das bandas R, já que

elas são menores que as bandas R, marcando somente as porções cromossômicas terminais ou os telômeros. Os cromossomos são submetidos a um tratamento com tampão aquecido, ocorrendo uma desnaturação, exceto nos telômeros, que são termorresistentes. A coloração pode ser feita com acridina laranja (fluorescente) ou com Giemsa.<sup>1</sup>

## Bandeamento G-11

As bandas G-11 (*Giemsa at pH 11*) são obtidas submetendo as metáfases a um tratamento alcalino alto. Nestas condições, somente o componente azul do Giemsa liga-se aos cromossomos, corando-os de azul-claro; o componente eosina do Giemsa liga-se a regiões cromossômicas específicas, corando-as de magenta.<sup>1</sup> Especula-se que o mecanismo para esta coloração seletiva seja a presença de regiões contendo um ou mais tipos específicos de DNAs satélites. Desta forma, este bandejamento é útil para descrever certos polimorfismos heterocromáticos que ocorrem na região pericentromérica dos cromossomos humanos 1, 3, 5, 7, 9, 10 e 20, na heterocromatina dos cromossomos 1, 9, 20 e na porção distal do Yq. Os centrômeros e os satélites dos cromossomos acrocêntricos também são corados neste bandejamento. As bandas G-11 ainda são usadas para diferenciar cromossomos humanos e de roedores em células híbridas. Os cromossomos humanos coram em azul-claro, enquanto que os de roedores coram em magenta. Entre outras várias aplicações, este bandejamento

também tem sido usado para analisar as relações cariotípicas entre o homem e outras espécies de primata.<sup>1,3</sup>

## Bandeamento Cd

Esta técnica produz dois pontos em cada centrômero (constricção primária), correspondentes a cada uma das cromátides, supostamente na região dos cinetócoros. Para a obtenção desta marcação, o material citológico é mergulhado em uma solução salina básica (BSS) de Earle aquecida a 85°C e corado com Giemsa. A banda Cd (*centromeric dot or kinetochore staining*) é observada somente nos centrômeros ativos ou funcionais, ao contrário das bandas C, que marcam tanto regiões centroméricas ativas como inativas. Por esta razão, esta coloração pode ser usada para distinguir os centrômeros funcionais dos não funcionais dos cromossomos dicêntricos estáveis. O bandejamento Cd também é usado nas análises de translocações robertsonianas (translocação entre os centrômeros de dois cromossomos acrocêntricos), de cromossomos em anel e de cromossomos marcadores. As bandas Cd são menores do que as bandas C, razão pela qual as extensas regiões heterocromáticas dos cromossomos 1, 9, 16 e Y não mostram esta coloração diferencial.<sup>1,3</sup>

## Colorações com fluorocromos

Os fluorocromos são corantes fluorescentes que possuem afinidades por regiões do DNA ricas ou em bases AT ou em bases GC,

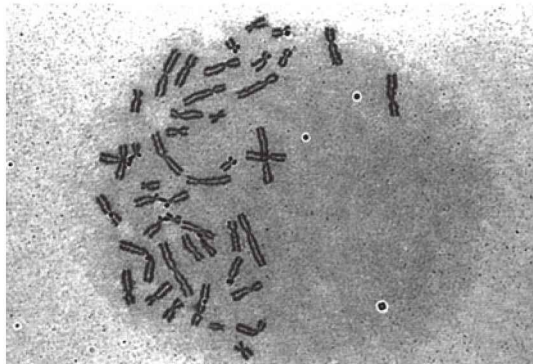
produzindo um padrão fluorescente característico. Dependendo de sua afinidade, os fluorocromos mostram um padrão básico similar a bandas Q ou bandas R. Muitos destes corantes fluorescentes produzem um padrão de coloração interessante e muito útil quando usados em combinação com outro ligante de DNA adequado. Estes métodos de coloração que utilizam dois produtos químicos diferentes ou dupla coloração são chamados de contra-coloração (*counterstaining techniques*). Nesses procedimentos, o fluorocromo, cuja fluorescência é observada no sentido de examinar os cromossomos, é chamado de corante primário, enquanto que o outro agente que se liga ao DNA é denominado contra-corante. Este último pode ser fluorescente ou não. Existem três combinações de corante primário e contra-corante, baseadas em suas afinidades pelas bases de DNA:

- corante primário específico-AT e contra-corante também específico-AT;
- corante primário específico-AT e contra-corante específico-GC; e
- corante primário específico-GC e contra-corante específico-AT.<sup>3</sup>

Os principais fluorocromos utilizados nestas técnicas de coloração são: (1) DAPI – 4,6-Diamino-2-Phenole-Indole (afinidade por bases AT); (2) Hoechst 33258 – 2-[4-hidrox yphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5 bi-1 H-benzimidazole (bases AT); (3) Quinacrina (bases GC); (4) CMA3 – Cromomicina A<sub>3</sub> (bases GC); (5) Olivomicina (bases GC), entre outros.<sup>3</sup>

**Figura 6.3**

Célula em metáfase com a técnica de coloração de bandas RON (cedida por Riegel, M. Medical Genetics Institute, Universität Zürich).



As principais combinações são: (1) DAPI/DA (Distamicina A; bases AT), (2) DAPI/MG (Methyl-Green; bases AT), (3) Hoechst 33258/DA, (4) Hoechst 33258/AMD (Actinomicina D; bases GC), (5) Quinacrina/AMD, (6) CMA3/MG, (7) CMA3/DAPI/DA, (8) Olivomicina/DA, entre outras.<sup>3</sup>

## Bandeamento com endonucleases de restrição (ERs)/Giemsa

A digestão do DNA cromossômico com diversas ERs e a posterior coloração com Giemsa é a técnica de bandejamento mais utilizado recentemente na marcação de regiões específicas dos cromossomos. O tratamento dos cromossomos com ERs produz um padrão característico de extração de DNA seguido por uma redução na coloração. Provavelmente a extração do DNA dependa do tamanho do fragmento de DNA produzido por uma enzima em particular. O tamanho do fragmento extraído, por sua vez, depende diretamente da distância entre dois sucessivos sítios de restrição enzima-específicos. Sendo assim, cromossomos humanos digeridos pela enzima *HaeIII* revelam um padrão semelhante ao bandejamento G. De um modo geral, os cromossomos humanos tratados com algumas enzimas (cuja sequência de reconhecimento possua quatro ou cinco pares de bases) e corados com Giemsa mostraram um padrão distinto de coloração. O padrão de coloração produzido por cada enzima é característico e reproduzível, fazendo com que ela possa ser usada em estudos clínicos e, ainda, aumentando o conhecimento sobre a natureza e as características das porções heterocromáticas do genoma humano.<sup>3</sup>

As endonucleases mais usadas e alguns dos seus padrões de marcações serão descritos a seguir.

- *AluI*/Giemsa – Os cromossomos apresentam uma redução da coloração, exceto em algumas regiões de bandas C positivas. O centrômero dos cromossomos 1, 5, 7, 9, 10, 16 e 19 e a porção distal do Yq mostram uma consistente banda escura.
- *DdeI*/Giemsa – O padrão mostrado é semelhante ao da endonuclease *AluI*, porém

só os cromossomos 1, 3, 9 e 16 mostram uma coloração escura mais intensa próxima ao centrômero.

- *HaeIII*/Giemsa – Diferentemente das outras ERs, esta enzima produz um padrão longitudinal nos cromossomos, semelhante ao bandejamento G, mas bandas escuras proeminentes também são obtidas na região centromérica dos cromossomos 1, 9 e 16 e na porção distal do Yq.
- *HinfI*/Giemsa – O tratamento com esta enzima reduz a coloração de praticamente todas as regiões dos cromossomos. Os cromossomos 1, 9, 16 e Y mostram um padrão de banda C negativa. Os cromossomos 3 e 4 apresentam bandas paracentroméricas escuras.
- *MboI*/Giemsa – As metáfases tratadas com esta endonuclease mostram uma redução geral da coloração, exceto nas regiões de bandas C positivas dos cromossomos 3, 5, 7, 10, 12, 17, 18 e 20. A porção distal do Yq mostra uma intensa banda escura.
- *RsaI*/Giemsa – Esta técnica produz um padrão de banda C modificado, com uma redução na coloração com Giemsa dos cromossomos. Os cromossomos 1, 2, 7, 11, 12, 17, 19 e 20 mostram bandas proeminentes na região centromérica. Os centrômeros dos cromossomos 9 e 16 apresentam bandas muito pequenas.

---

## Hibridização *in situ* por fluorescência

Nas últimas décadas, os avanços da biologia molecular, combinados com técnicas de citogenética convencional, resultaram em novas marcações cromossômicas, descritas no campo chamado de Citogenética Molecular. Um dos métodos mais difundidos atualmente é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH, de *fluorescence in situ hybridization*), que consiste na ligação de sequências de DNA marcadas com fluorocromos (sondas) aos genes ou cromossomos-alvo complementares. A marcação cromossomo-específica é visualizada como pontos fluorescentes de uma ou várias cores diferentes. As grandes vantagens

deste método são o uso de fluorescentes não radioativos e a visualização da marcação cromossômica em células interfásicas. Devido a

sua importância e ao grande número de variações e aplicações desta técnica, ela será vista em um capítulo exclusivo (Capítulo 28).

---

## Referências

1. Keagle MB, Gersen SL. The principle of clinical cytogenetics. 2nd ed. Totowa, NJ; 2005. p.63-79.
2. Harden DG, Klinger HP, editors. ISCN (1985): an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 1985.
3. Verma RS, Babu A. Human chromosomes: principles and techniques. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1995. p. 72-133.



# Alterações cromossômicas numéricas

## Introdução

A estabilidade do número e da estrutura dos cromossomos é fundamental para que o desenvolvimento ocorra de maneira correta. Como os genes estão dispostos nos cromossomos, qualquer modificação em sua estrutura ou número pode alterar a expressão gênica, produzindo um indivíduo fenotipicamente inviável ou anormal. Como descrito no Capítulo 3, cada cromossomo é uma fita de DNA linear e contínua que contém um número variável de genes. A partir desse conhecimento, pode-se supor que uma alteração no número de cromossomos deva trazer consequências graves ao fenótipo do portador, pelo aumento ou pela diminuição do número de cópias dos genes presentes no cromossomo envolvido. Desta forma, poucas alterações no número de cromossomos são compatíveis com a vida, quando presentes em todas as células do indivíduo.

As alterações cromossômicas são responsáveis por 42% dos abortos espontâneos e ocorrem em 1 em cada 160 nativos (**Tabela 7.1**).<sup>1</sup> Elas são classificadas em dois grandes grupos: as numéricas, mais comuns, que podem ocorrer por alterações dos cromossomos autossômicos 13, 18, 21 e sexuais (monossomia do X); e as estruturais, menos comuns que as numéricas, que podem afetar um ou mais cromossomos, autossômicos ou sexuais.

As consequências de uma anomalia cromossômica no fenótipo dependem de vários

fatores: sua natureza, o desequilíbrio resultante nas partes envolvidas do genoma, os genes específicos contidos ou afetados pela anomalia e a probabilidade de sua transmissão para as próximas gerações. A previsão desses resultados é um grande desafio para a consulta genética, particularmente em um contexto pré-natal. De maneira geral, sabe-se que a perda de material codificante é mais grave que o ganho deste material. Por isso, as monossomias dos cromossomos autossômicos são todas inviáveis (não são compatíveis com a vida), enquanto as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21 podem vir a termo. As alterações que envolvem os cromossomos sexuais tendem a ser menos deletérias que as alterações dos cromossomos autossômicos – isso se deve ao mecanismo de inativação do X (ver Capítulo 10) e também ao fato de o cromossomo Y possuir poucos genes (relativamente aos outros cromossomos), apresentando grande quantidade de heterocromatina não codificante. Vejamos os tipos específicos de anomalias cromossômicas.

## Classificação das alterações cromossômicas numéricas

As alterações numéricas correspondem ao acréscimo ou à perda de um ou mais cromossomos, e são classificadas em dois tipos: euploidias e aneuploidias.

Quando o número de cromossomos presentes nas células é diferente de 46, denomina-se

o cariótipo como sendo heteroploide. Uma heteroploidia ou cromossomopatia numérica, com um múltiplo exato do número haploide de cromossomos a mais, além do número diploide básico de cromossomos, é chamada de euploidia. Qualquer outra constituição cromossômica, como a perda ou a adição de cromossomos, em um número não múltiplo do conjunto haploide, é chamada de aneuploidia.

Euploidias

As euploidias são alterações que envolvem todo o genoma, originando células que contêm um múltiplo exato de 23 cromossomos em seu núcleo, ou seja, um conjunto haploide a mais nas células, além do conjunto normal básico de cromossomos. Na espécie humana, a ocorrência de euploidias é incompatível com a vida. Praticamente todos os casos de triploidia e tetraploidia que chegaram a termo eram de natimortos ou de morte neonatal. Verifica-se que, entre os abortos espontâneos com alterações cromossômicas, cerca de 19%

mostram triploidia e cerca de 4% apresentam tetraploidia.<sup>2,3</sup>

Triploidia

Na espécie humana se desconhecem indivíduos que sejam totalmente poliploides (3n, 4n). Casos de triploidias e tetraploidias (muito mais raras) são letais e observados em abortamentos espontâneos, sendo raros os casos que chegam a termo. A triploidia é a aberração cromossômica mais frequente em abortamentos de primeiro trimestre. Das concepções observadas, 1 a 3% são triploides. Antes da realização de estudos com marcadores moleculares, acreditava-se que a maioria dos casos de triploidia era resultado de um óvulo fertilizado por dois espermatozoides (dispermia), mas com as análises moleculares, ficou evidenciado que aproximadamente 80% dos casos são causados pela incorporação de um corpúsculo polar no oócito (**Figura 7.1**).<sup>4</sup> A manifestação do fenótipo de um cariótipo triploide depende da fonte do conjunto extra

TABELA 7.1  
Anomalias cromossômicas entre nascidos vivos

Nascidos vivos masculinos	61.484		
Nascidos vivos femininos	41.585		
Tipo de anormalidade		Casos	Taxa
Trissomias autossômicas			
47,+21		141	1/730
47,+18		19	1/5.424
47,+13		6	1/17.178
Anomalias sexuais			
47,XXY		73	1/842
47,XYY		66	1/931
47,XXX		45	1/924
45,X		15	1/2.772
Anomalias estruturais			
Balanceada		139	1/490
Não balanceada		43	1/1.516
Anomalias totais		736	1/140

Fonte: Adaptada de Hsu L. Y, F.<sup>1</sup>

de cromossomos. Quando de origem paterna, há uma placenta anormal, o que é classificado como mola hidatiforme parcial e, quando de origem materna, há abortamento espontâneo e precoce na gestação.

### Possíveis cariótipos triploides

69,XXX  
69,XXY  
69,XXY

### Tetraploidia

Não é surpreendente que os zigotos tetraploides sejam mais raros que os triploides, pois a tetraploidia não mosaico também é incompatível com a vida, e o mais importante, existem menos mecanismos que os originem. A ausência de constituições de cromossomos sexuais XXXY ou XYYY sugere que a tetraploidia re-

sulta do insucesso de uma clivagem inicial na divisão do zigoto (endomitose) (**Figura 7.2**).

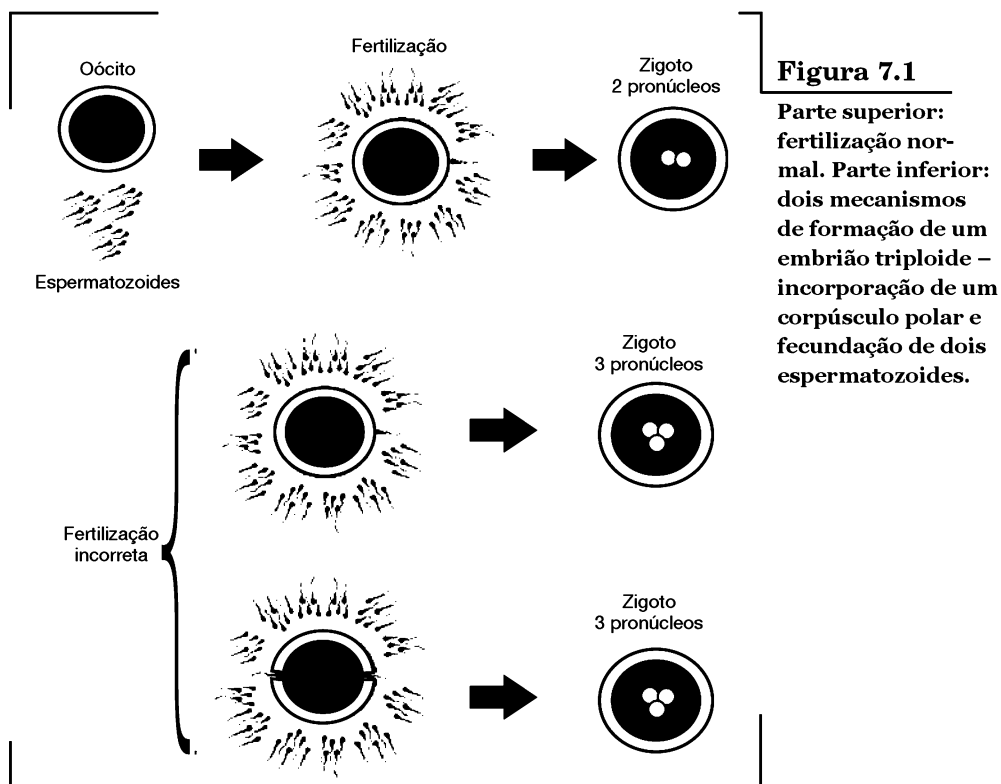
### Possíveis cariótipos tetraploides

92,XXXX  
92,XXYY

### Aneuploidias

A aneuploidia ocorre quando o número de cromossomos a mais não é um múltiplo exato do número haploide, em decorrência da não disjunção ou não separação adequada de um ou mais cromossomos durante a meiose. A aneuploidia é a anomalia cromossômica mais comum em humanos, sendo a líder das causas de abortamentos espontâneos e defeitos congênitos ao nascimento.<sup>5</sup>

Cerca de 50% dos abortos espontâneos antes de 15 semanas de gestação são cromos-



somicamente aneuploides.<sup>6</sup> A idade materna avançada continua sendo o fator de risco mais provável para a não disjunção,<sup>5,7</sup> mas os mecanismos biológicos do fenômeno ainda não estão bem esclarecidos (**Tabela 7.2**).<sup>4</sup> Devido ao efeito da idade materna, a não disjunção dos cromossomos na espermatogênese não tem equivalência à da ovogênese na produção de indivíduos com aneuploidias dos cromossomos sexuais ou dos autossomos, ou seja, a origem materna é mais frequente.

As consequências da não disjunção durante a meiose I e a meiose II são diferentes: quando a não disjunção ocorre na meiose I, os gametas apresentam um representante de ambos os membros do par de cromossomos, um de origem materna e outro de origem paterna, ou não possuem todo um cromossomo no outro gameta. Quando o erro ocorre na meiose II, os gametas anormais, com um cromossomo extra, contêm duas cópias do mesmo cromossomo parental (**Figura 7.3**).

A não disjunção pode ocorrer nas primeiras divisões mitóticas, após a formação do zigoto, dando origem a duas ou mais linhagens de cé-

lulas no mesmo indivíduo, evento conhecido como mosaïcismo. O mosaïcismo caracteriza-se pela existência de mais de uma linhagem celular no mesmo indivíduo, sendo que, no caso da citogenética, são linhagens cromossomicamente diferentes.

## Monossomias

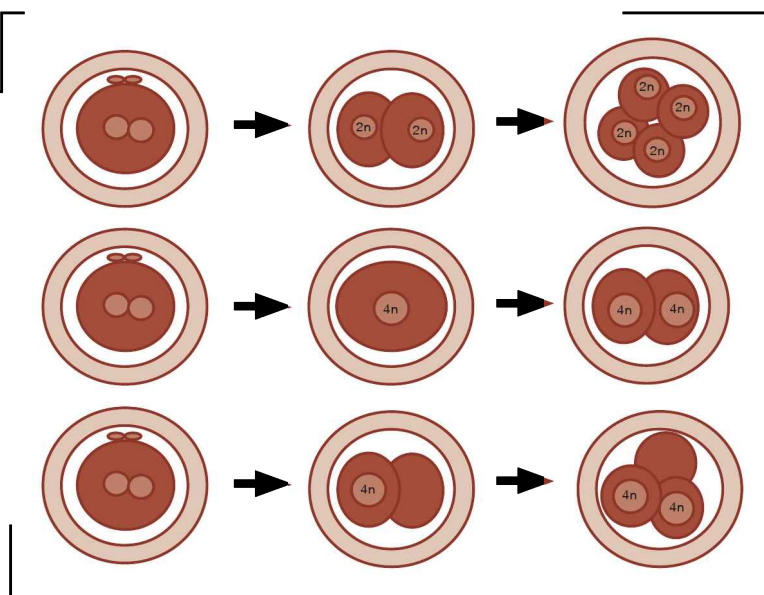
Chamamos de monossomia o cariótipo em que um dos cromossomos do par não está presente, formando uma constituição cromossômica com 45 cromossomos. As monossomias dos cromossomos autossômicos não são compatíveis com a vida. A monossomia do cromossomo X causa a síndrome de Turner, que será discutida em detalhes no Capítulo 10. Para o diagnóstico do câncer, é possível encontrar linhagens monossômicas nas células neoplásicas.

### Exemplos de cariótipos monossômicos

**45,X** – Monossomia do cromossomo X – esse é o cariótipo clássico da síndrome de Turner.

**45,XY,-7** – Cariótipo masculino com monossomia do cromossomo 7.

**Figura 7.2**  
A linha de cima mostra a divisão normal do zigoto. As outras duas linhas mostram os possíveis mecanismos de formação do embrião tetraploide.



Trissomias

As trissomias são aneuploidias em que a constituição cromossômica tem um cromossomo a mais, ou seja, um terceiro em relação ao seu par normal. É o tipo de situação mais comum de distúrbios cromossômicos humanos, ocorrendo em aproximadamente 5% de todas as gestações conhecidas. Um desenvolvimento importante no diagnóstico de aneuploidias, especialmente em pré-natal, é a técnica de FISH aplicada às células em interfase, permitindo um rápido diagnóstico para avaliar aneuploidias para os cromossomos 13, 18, 21, X e Y, sem a necessidade de cultura de células, pois são estes os cinco cromossomos responsáveis pela maioria das aneuploidias em indivíduos nascidos com vida (ver Capítulos 29 e 31).

Exemplos de cariótipos trissômicos

**47,XX,+21** – Cariótipo feminino com trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down).

**47,XY,+18** – Cariótipo masculino com trissomia do cromossomo 18 (síndrome de Edwards).

Tetrassomias e pentassomias

As tetrassomias e pentassomias autossômicas não são compatíveis com a vida. Porém, pode-se observar essas alterações envolvendo os cromossomos sexuais (ver Capítulo 10). Sempre que houver mais de um cromossomo X na células, apenas um deles não será inativado, tornando possível a sobrevivência de indivíduos com 48 e até 49 cromossomos.

Exemplos de cariótipos tetrassômicos e pentassômicos

**48,XXYY** – Cariótipo com tetrassomia dos cromossomos sexuais (uma variação da síndrome de Klinefelter).

**49,XXXXY** – Cariótipo com pentassomia dos cromossomos sexuais (uma variação da síndrome de Klinefelter).

Trissomias de cromossomos autossômicos

Indivíduos com aberrações cromossômicas desbalanceadas possuem múltiplas anoma-

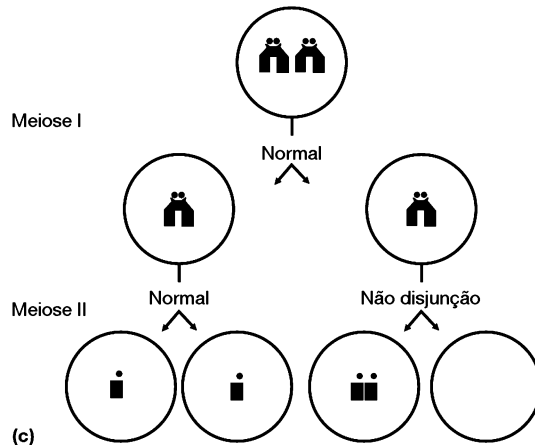
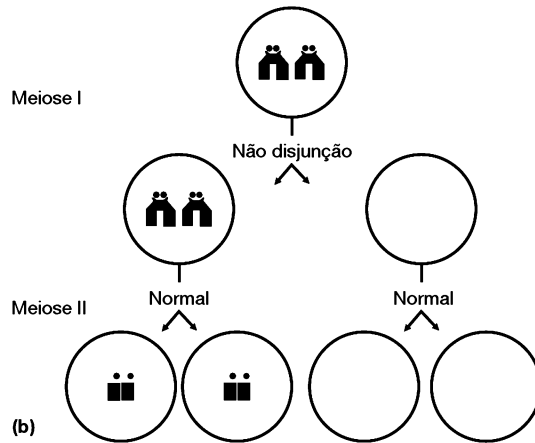
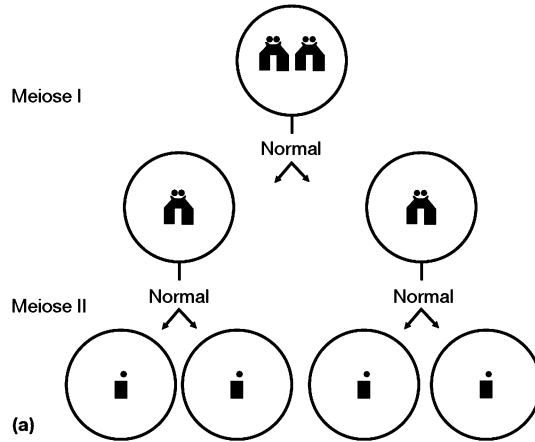
TABELA 7.2  
Risco de anomalias cromossômicas relacionadas à idade materna

Idade materna (anos)	Dados de nascidos vivos		Dados de amniocenteses	
	Trissomia 21	Todas anomalias cromossômicas	Trissomia 21	Todas anomalias cromossômicas
33	1/625	1/345	1/416	1/208
34	1/500	1/277	1/333	1/151
35	1/385	1/204	1/250	1/132
36	1/303	1/167	1/192	1/105
37	1/227	1/130	1/149	1/83
38	1/175	1/103	1/115	1/65
39	1/137	1/81	1/89	1/53
40	1/106	1/63	1/69	1/40
41	1/81	1/50	1/53	1/31
42	1/64	1/39	1/41	1/25
43	1/50	1/30	1/31	1/19
44	1/38	1/24	1/25	1/15
45	1/30	1/19	1/19	1/12

Fonte: Adaptada de Schreinemachers e colaboradores.<sup>8</sup>

**Figura 7.3**

- (a) Meiose normal, ocorrendo disjunção dos cromossomos em meiose I e II.
- (b) Não disjunção em meiose I – os cromossomos materno e paterno deslocam-se para a mesma célula-filha.
- (c) Não disjunção em meiose II – na separação centrômerica, as duas cromátides, ou cromossomos-filhos, deslocam-se para formar o mesmo gameta.



lias congênitas que podem envolver diversos sistemas. Retardo mental, restrição de crescimento e baixo ganho pômdero-estatural são características constantes.

## Trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down)

A trissomia 21 é a aberração cromossômica mais comum em nascidos vivos (1:730) e a maior causa de retardo mental devido a anomalia cromossômica.<sup>9</sup> Os três tipos de alterações citogenéticas que podem resultar em síndrome de Down são:

- Trissomia 21 (47,+21): aproximadamente 94%. Um cromossomo 21 extra está presente em todas as células do indivíduo.
- Translocação robertsoniana envolvendo o cromossomo 21: 3 a 4% (ver Capítulo 9).
- Mosaicismo de trissomia 21 (47,+21/46): 2 a 3%. Duas populações de células, uma normal, com 46 cromossomos, e outra com 47,+21.

Erros na meiose que resultam na não disjunção geralmente são de origem materna. Somente 5% ocorrem na espermatogênese.<sup>10</sup> Isso explica, em parte, por que o risco de síndrome de Down aumenta com o avanço da idade materna.

## Manifestações clínicas

As características dismórficas estão presentes em 47 a 82% dos casos. Essas características afetam predominantemente a cabeça, o pescoço e as extremidades.<sup>11</sup>

### Cabeça e pescoço:

- Braquicefalia
- Fissuras palpebrais oblíquas para cima
- Pregas epicânticas
- Manchas de Brushfield na íris
- Ponte nasal baixa
- Orelhas dobradas
- Orelhas pequenas
- Boca aberta
- Macroglossia

- Palato estreito
- Anormalidades dentárias
- Pescoço curto
- Pele excessiva na nuca

### Extremidades:

- Mãos pequenas e largas
- Clinodactilia de quinto quirodáctilo
- Prega palmar única
- Aumento do espaço entre o primeiro e o segundo artelhos
- Hiperflexibilidade de articulações

### Características neonatais:

Entre todas as dismorfias, 10 são comuns em recém-nascidos com síndrome de Down e são, geralmente, reconhecidas logo após o nascimento. Em uma série de 48 recém-nascidos afetados, todos possuíam quatro ou mais dessas características e 89% possuíam seis ou mais.<sup>12</sup> São elas:

- Face achatada
- Reflexo de Moro débil
- Pele excessiva na nuca
- Fissuras palpebrais oblíquas
- Hipotonia
- Hiperflexibilidade de articulações
- Displasia da pelve
- Anormalidades de orelhas
- Clinodactilia
- Prega palmar única

Praticamente todos os pacientes com síndrome de Down possuem comprometimento cognitivo, a maioria com retardo mental de leve a moderado. O atraso do desenvolvimento fica aparente no primeiro ano de vida, com idade média para sentar de 11 meses (normal entre 6 e 7 meses) e andar de 26 meses (normal 12 meses).

Metade dos pacientes apresenta malformação congênita do coração.<sup>13</sup> As alterações mais comuns são defeito do septo átrio-ventricular (45%) e defeito do septo ventricular (35%). Em 5% dos casos, os pacientes apresentam malformações do trato gastrointestinal, como atresia ou estenose duodenal, pâncreas anu-

lar, ânus imperfurado ou atresia esofágica. Doença de Hirschsprung é mais comum em pacientes com síndrome de Down do que na população em geral, embora o risco seja inferior a 1%.<sup>13</sup> Há uma forte associação entre doença celíaca e síndrome de Down. Sua prevalência chega a ser 16 vezes maior do que no restante da população.<sup>14</sup> Os pacientes podem ainda apresentar alterações oftalmológicas e auditivas: otite média é uma queixa frequente, afetando de 50 a 70% dos pacientes.

A prevalência de obesidade também é maior no grupo de pacientes com síndrome de Down. Acredita-se que seja resultado da menor taxa metabólica no repouso que os pacientes apresentam. A maioria das crianças é obesa a partir dos 3 ou 4 anos de idade.<sup>15</sup>

Aproximadamente 65% dos pacientes apresentam policitemia e macrocitose, e o risco de desenvolvimento de leucemia chega a 1,5%.<sup>16</sup> A síndrome de Down está relacionada a diversas formas de comprometimento imunológico que aumentam a suscetibilidade a infecções, malignidades e doenças autoimunes.<sup>17</sup> Por isso, doenças da tireoide e diabetes são comuns nesses pacientes.

Mulheres com síndrome de Down são férteis e podem engravidar. Já os homens são inférteis devido ao comprometimento da espermatogênese, embora existam relatos de casos de pais com síndrome de Down.<sup>18</sup>

## Trissomia do cromossomo 18

A trissomia 18 (antigamente também chamada de síndrome de Edwards) é a segunda trissomia de cromossomos autossômicos mais frequente (1 para 5.500 nascidos vivos). Assim como a trissomia 21, há relação com o avanço da idade materna, e 90% dos casos são resultado de não disjunção meiótica.

### *Manifestações clínicas*

As características mais prevalentes são hipertonia, osso occipital proeminente, boca pequena, micrognatia, osso esterno curto, rim em ferradura, tecido pancreático ectópico, pelve pequena, segundo e quinto dedos da mão sobrepostos aos demais e pés em mata-borrão.

Malformação cardíaca congênita ocorre em mais de 50% dos casos. Os defeitos mais comuns são persistência do ducto arterioso e defeito do septo ventricular. O sistema gastrointestinal está envolvido em 75% dos casos, com divertículo de Meckel e malrotação como anormalidades predominantes.

Os achados pré-natais incluem restrição de crescimento intrauterino associada a polidrâmnio. Cinquenta por cento das crianças afetadas falecem na primeira semana de vida, e apenas 5 a 10% sobrevivem no primeiro ano de vida. Grave comprometimento mental é aparente nos sobreviventes.<sup>11</sup>

## Trissomia do cromossomo 13

As três etiologias da trissomia 13 (antigamente chamada de síndrome de Patau) são:

- Trissomia 13 (47,+13): um cromossomo 21 extra está presente em todas as células do indivíduo.
- Translocação robertsoniana envolvendo o braço longo do cromossomo 13 (ver Capítulo 9).
- Mosaicismo (47,+13/46): duas populações de células, uma normal, com 46 cromossomos, e outra com 47,+21.

### *Manifestações clínicas*

A maioria das características fenotípicas da trissomia 13 é resultado de um defeito precoce do desenvolvimento do mesoderma precordial, que origina a face média, os olhos e o cérebro anterior. Essas anomalias incluem holoprosencefalia, ausência do nervo e/ou bulbo olfatório, graves defeitos oculares, surdez, fenda labial e palatina. Outros defeitos observados: onfalocele, hérnia umbilical, anomalias geniturinárias, hemangiomas, polidactilia, pés em mata-borrão e malformações cardíacas.

Achados ultrassonográficos pré-natais demonstram defeitos do sistema nervoso central. Oitenta por cento dos pacientes falecem no primeiro mês de vida. Apenas 5% sobrevivem até os 6 meses. Grave comprometimento mental, convulsões e déficit de ganho pondero-estatural são notáveis nos sobreviventes após um ano de vida.<sup>19</sup>



## Outras trissomias de cromossomos autossômicos

### *Trissomia do cromossomo 16*

É a trissomia mais comum entre abortos. Nunca encontrada em nascidos vivos.<sup>20</sup>

### *Trissomia do cromossomo 8*

Mais de 100 casos já foram descritos. A maioria desses indivíduos são mosaicos (47,+8/46), uma vez que a trissomia total do cromossomo 8 é letal.<sup>21</sup> O diagnóstico clínico dessa trissomia é difícil, devido ao fato de as alterações serem sutis e não detectadas pela ultrassonografia pré-natal.

As características mais comuns são lábios grossos, anomalias ósseas como clinodactilia, camptodactilia, anomalias vertebrais e de quadril. O crescimento das crianças é variável, sendo que podem ser pequenas ou possuírem alta estatura. Comprometimento cognitivo pode ser leve ou grave.<sup>22</sup>

A história natural dessa doença depende do grau de comprometimento que as anormalidades produzem e parece estar relacionada à proporção de trissomia 8 e de células normais no indivíduo afetado.

### *Trissomia do cromossomo 9*

A trissomia 9, mosaico (47,+9/46) ou não mosaico (47,+9), é uma entidade clínica incomum, com menos de 50 casos pós-natais descritos.<sup>23</sup> As anomalias fenotípicas compreendem restrição de crescimento, face dismórfica com orelhas malformadas, microftalmia, nariz bulboso. Estão ainda presentes malformações cardíacas, renais e esqueléticas. A gravidade do quadro é relacionada à proporção de células trissômicas nos diferentes tecidos.

Outras trissomias autossômicas são ainda mais raras do que as expostas anteriormente e são descritas em alguns relatos de casos.<sup>24-26</sup>

A maioria desses indivíduos apresenta mosaicismos. Como exemplo, a trissomia do cromossomo 14 (47,+14/46) é associada a comprometimento cognitivo e de crescimento, malformações cardíacas (especialmente tetragia de Fallot e defeitos septais) e assimetria de face ou corpo. Por comparação, a trissomia do cromossomo 22 pode ocorrer como mosaico ou como trissomia completa. As características mais marcantes são restrição de crescimento intrauterino, microcefalia, anomalias de orelhas, pescoço alado, malformação cardíaca e dedos longos.

## Referências

1. Hsu LYF. Prenatal of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In: Milunsky A, editor. Genetics disorders and the fetus. 4th ed. Baltimore: John Hopkins University Press;1998. p. 179-248.
2. Carr DH. Chromosome anomalies as a cause of spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol. 1967 Feb 1;97(3):283-93.
3. Boué JG, Boué A. Chromosome aberrations in human spontaneous abortion. Presse Med. 1970 Mar 21;78(14):635-41.
4. Schinzel A. How human chromosome aberrations are formed. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. [Internet]. Poitiers, France: Jean-Loup Huret, Genetics DIM, University Hospital; 2007 Jul [capturado em 2010 Jun 12]. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromAberFormedID30065ES.html>
5. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Hum Mol Genet. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R203-8.
6. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet. 1980 Oct;44(Pt 2):151-78.
7. Penrose LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. 1933. J Genet. 2009 Apr;88(1):9-14.
8. Schreinemachers DM, Cross PK, Hook EB. Rates of trisomies 21, 18, 13 and other chromosome abnormalities in about 20 000 prenatal studies compared with estimated rates in live births. Hum Genet. 1982;61(4):318-24.
9. Collins VR, Muggli EE, Riley M, Palma S, Halliday JL. Is Down syndrome a disappearing birth defect? J Pediatr. 2008 Jan;152(1):20-4.
10. Kazaura MR, Lie RT. Down's syndrome and paternal age in Norway. Paediatr Perinat Epidemiol. 2002 Oct;16(4):314-9.

11. Jones K. Smith's recognizable patterns of human malformation. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 7-9.
12. Epstein CJ. Down syndrome (Trisomy 21). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. McGraw-Hill, New York; 2001. p.1223-56.
13. American Academy of Pediatrics. Committee on Genetics. American Academy of Pediatrics: Health supervision for children with Down syndrome. Pediatrics. 2001 Feb;107(2):442-9.
14. Book L, Hart A, Black J, Feolo M, Zone JJ, Neuhausen SL. Prevalence and clinical characteristics of celiac disease in Down syndrome in a US study. Am J Med Genet. 2001 Jan 1;98(1):70-4.
15. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. Lancet. 2003 Apr 12;361(9365):1281-9.
16. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. Blood. 2009 Mar 19;113(12):2619-28.
17. Ugazio AG, Maccario R, Notarangelo LD, Burgio GR. Immunology of Down syndrome: a review. Am J Med Genet Suppl. 1990;7:204-12.
18. Sheridan R, Llerena J Jr, Matkins S, Debenham P, Cawood A, Bobrow M. Fertility in a male with trisomy 21. J Med Genet. 1989 May;26(5):294-8.
19. Tolmie JL. Down syndrome and other autosomal trisomies. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p. 925-71.
20. Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conception. In: Porter IH, Willey A, editors. perinatal genetics diagnosis and treatment. New York: Academic Press; 1986. p. 133-48.
21. Riccardi VM. Trisomy 8: an international study of 70 patients. Birth Defects Orig Artic Ser. 1977;13(3C):171-84.
22. Schinzel A. Trisomy 8 and trisomy 9 are distinctly different clinical entities. Am J Med Genet. 1993 Jun 15;46(5):603-4.
23. Arnold GL, Kirby RS, Stern TP, Sawyer JR. Trisomy 9: review and report of two new cases. Am J Med Genet. 1995 Apr 10;56(3):252-7.
24. Fujimoto A, Allanson J, Crowe CA, Lipson MH, Johnson VP. Natural history of mosaic trisomy 14 syndrome. Am J Med Genet. 1992 Sep 15;44(2):189-96.
25. Hsu LY, Shapiro LR, Gertner M, Lieber E, Hirschhorn K. Trisomy 22: a clinical entity. J Pediatr. 1971 Jul;79(1):12-9.
26. Bacino CA, Schreck R, Fischel-Ghodsian N, Pepkowitz S, Prezant TR, Graham JM Jr. Clinical and molecular studies in full trisomy 22: further delineation of the phenotype and review of the literature. Am J Med Genet. 1995 May 8;56(4):359-65.

---

## Leituras recomendadas

- Borges-Osório MR, Robinson WM. Genética humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ, et al. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. Am J Med Genet. 1998 Nov 16;80(3):213-7.
- Hassold TJ. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. Am J Hum Genet. 1980 Sep;32(5):723-30.
- Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White LL. Genética médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 101-5.
- Matsunaga E, Tonomura A, Oishi H, Kikuchi Y. Reexamination of paternal age effect in Down's syndrome. Hum Genet. 1978 Feb 16;40(3):259-68.
- Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. Hum Reprod. 1998 Feb;13(2):313-9.
- Otto SP, Whitton J. Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet. 2000;34:401-437.
- Stene J, Fischer G, Stene E, Mikkelsen M, Petersen E. Paternal age effect in Down's syndrome. Ann Hum Genet. 1977 Jan;40(3):299-306.
- Stene J, Stene E. Statistical methods for detecting a moderate paternal age effect on incidence of disorder when a maternal one is present. Ann Hum Genet. 1977 Jan;40(3):343-53.
- Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. Hum Genet. 1994 Oct;94(4):411-7.

# Alterações cromossômicas estruturais

## Introdução

O desenvolvimento de técnicas de bandejamento cromossômico, como a técnica de bandas G, que permite identificar cada um dos 24 cromossomos humanos e detectar qualquer alteração em sua estrutura, representou um grande avanço para a citogenética clínica. As alterações na estrutura dos cromossomos podem ser balanceadas, ou seja, sem perda nem ganho de material genético, com significado fenotípico, ou não balanceadas. As alterações cromossômicas estruturais, assim como as numéricas, podem ocorrer em todas as células do paciente, ou em mosaico, atingindo apenas uma parte das células.

As alterações cromossômicas estruturais podem aparecer em neonatos com distorfas ou problemas neurológicos, quando existe perda ou ganho de material genético, mas muitas vezes o portador de uma alteração estrutural não manifesta alterações clínicas. Entretanto, podem surgir consequências como a infertilidade ou uma prole com possibilidade de apresentar problemas genéticos. Isto é explicado pela segregação dos cromossomos anormais após o pareamento na meiose I. A nomenclatura utilizada nos exemplos deste capítulo está baseada no Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética.<sup>1</sup>

## Alterações não balanceadas

Uma célula humana normal possui exatamente 46 cromossomos, e qualquer porção

destes que esteja a mais ou a menos pode acarretar em consequências clínicas ao seu portador.

## Deleção (del)

Como o próprio nome sugere, a deleção é definida pela perda de um segmento em um dos braços do cromossomo, gerando uma monossomia parcial do segmento deletado. A deleção pode ser terminal (**Figura 8.1a.**) quando, a partir de um ponto de quebra, ocorre a perda do segmento até a porção terminal do braço afetado. Quando duas quebras acontecem em um mesmo braço, o segmento intermediário pode ser perdido, com posterior união dos pontos de quebra, formando assim um cromossomo menor que seu homólogo, devido à perda de uma porção intersticial. Este tipo de deleção é denominado intersticial (**Figura 8.1b.**), sendo que durante a meiose o cromossomo normal forma uma alça na porção deletada de seu homólogo para que as porções de homologia possam parear (**Figura 8.1c.**).

Outro mecanismo de formação da deleção é um *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos desalinhados, que também pode formar um segmento duplicado. Algumas deleções de importância clínica são muito pequenas para serem detectadas por técnicas de citogenética convencional, sendo necessárias técnicas moleculares, como a FISH, para sua detecção (ver Capítulo 28). Essas deleções serão tratadas no Capítulo 27, separadamente.

## Exemplos<sup>1</sup>

### Deleções terminais

#### 46,XX,del(2)(q33)

Cariótipo feminino com a porção terminal do braço longo do cromossomo 2 deletada a partir da banda q33.

#### 46,XY,del(5)(q?)

Cariótipo masculino com deleção no braço longo do cromossomo 5. Neste caso, não foi possível identificar a banda de localização do ponto de quebra.

#### 46,X,del(X)(p22)

Cariótipo feminino com a porção terminal do braço curto do cromossomo X deletada a partir da banda p22.

#### 46,XY,del(16)(p13)

Cariótipo masculino com a porção terminal do braço curto do cromossomo 16 deletada a partir da banda p13 (**Figura 8.2**).

### Deleções intersticiais

#### 46,XX,del(3)(q21q26)

Cariótipo feminino com a porção intersticial do braço longo do cromossomo 3 deletada entre as bandas q21 e q26.

#### 46,XX,del(7)(p14p15)

Cariótipo feminino com a porção intersticial do braço curto do cromossomo 7 deletada entre as bandas p14 e p15.

#### 46,XY,del(1)(q12q24)

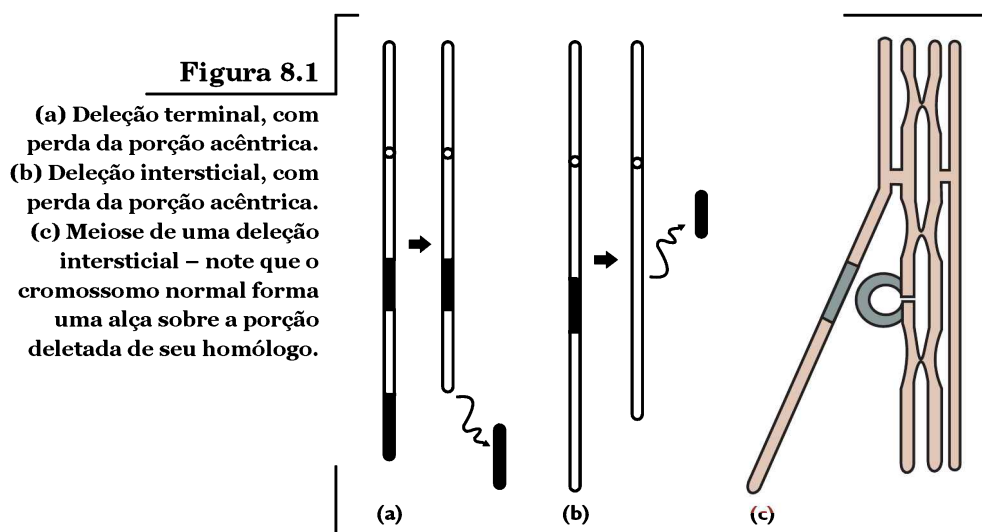
Cariótipo masculino com a porção intersticial do braço longo do cromossomo 1 deletada entre as bandas q12 e q24 (**Figura 8.3**).

## Duplicação (dup)

A duplicação ocorre quando um segmento cromossômico está presente duas vezes no mesmo cromossomo, gerando uma trissomia parcial do segmento duplicado (**Figura 8.4**). Assim como as deleções, as duplicações podem não ser visíveis ao microscópio por bandeamento convencional, sendo necessária a aplicação de técnicas de maior resolução, como a citogenética molecular.

As duplicações podem ser diretas, quando o segmento duplicado apresenta a sequência de DNA no mesmo sentido da sequência inicial, ou invertidas, quando o segmento duplicado apresenta-se no sentido oposto ao sentido original do cromossomo. A duplicação direta pode ser formada por um *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos desalinhados, que também pode formar um segmento deletado.

Alguns casos raros de segmentos cromossômicos triplicados, que geram uma tetrassomia parcial no paciente, foram observados nos braços cromossômicos 9p, 18p, 15 (pter→q13) e 22 (pter→q11) e, ainda em casos em mosaico de triplicações dos braços 5p, 8p e 12p.<sup>2</sup>



Quadruplicações de pequenos segmentos cromossômicos também já foram observadas.

### Exemplos

#### Duplicações diretas

##### 46,XY,dup(8)(p21p23)

Cariótipo masculino com duplicação direta no braço curto do cromossomo 8 entre as bandas p21 e p23.

##### 46,XX,dup(11)(q21q23)

Cariótipo feminino com duplicação direta no braço longo do cromossomo 11 entre as bandas q21 e q23.

##### 46,XY,dup(7)(q21q22)

Cariótipo masculino com duplicação direta no braço longo do cromossomo 7 entre as bandas q21 e q22 (**Figura 8.5**).

#### Duplicações invertidas

##### 46,XX,dup(6)(q23q16)

Cariótipo feminino com duplicação invertida no braço longo do cromossomo 6 entre as bandas q23 e q16.

##### 46,XY,dup(4)(p15p14)

Cariótipo masculino com duplicação invertida no braço curto do cromossomo 4 entre as bandas p15 e p14.

#### Triplicações (trp)

##### 46,XX,trp(10)(q11q23)

Cariótipo feminino com triplicação direta no braço longo do cromossomo 10 entre as bandas q11 e q23.

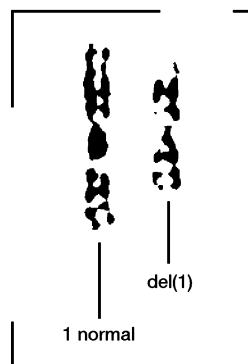
##### 46,XX,inv trp(1)(p31p13)

Cariótipo feminino com triplicação invertida no braço curto do cromossomo 1 entre as bandas p31 e p13.



**Figura 8.2**

Deleção 46,xy,  
del(16)(p13).



**Figura 8.3**

Deleção 46,xy  
del(1)(q12q24).

#### Quadruplicações (qdp)

##### 46,XY,qdp(6)(p21p23)

Cariótipo masculino com quadruplicação direta no braço curto do cromossomo 6 entre as bandas p21 e p23.

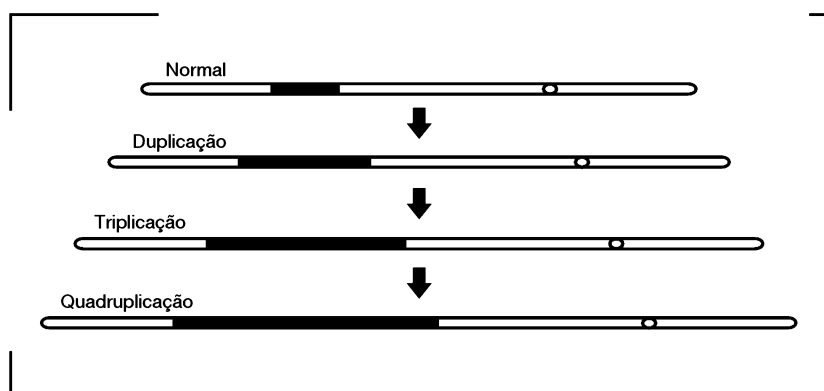
#### Isocromossomo (i)

O isocromossomo resulta da perda de um dos braços (monossomia parcial) e duplicação do outro (trissomia parcial). Portanto, tais quebras, no centrômero ou perto dele, formam primeiro um cromossomo telocêntrico com um centrômero instável, o qual, durante a interfase, afasta as cromátides-irmãs, dando origem, na próxima metáfase, a um cromossomo com dois braços iguais (**Figura 8.6**). Também é possível que translocações de braço inteiro resultem em isocromossomo, onde o braço não translocado permaneça com o centrômero instável. Há, ainda, a possibilidade de trocas entre cromátides-irmãs, em uma região muito próxima ao centrômero. Nesse caso, o cromossomo formado teria dois centrômeros, sendo denominado isodicêntrico. O achado mais frequente em cariótipo constitucional é o isocromossomo do braço longo do X em pacientes com síndrome de Turner (ver Capítulo 9).

### Exemplos

##### 46,X,i(Y)(q10)

Cariótipo masculino com isocromossomo do braço longo inteiro do cromossomo Y; portan-

**Figura 8.4**

Esquema de duplicação, triplicação e quadruplicação.

to, a banda utilizada é a q10, que é a localização do centrômero.

#### **46,XY,i(17)(q10)**

Cariótipo masculino com isocromossomo do braço longo do cromossomo 17.

#### **46,X,i(X)(q10)[23]/45,X[17]**

Cariótipo feminino portador de síndrome de Turner com mosaicismo, apresentando duas linhagens celulares – uma contendo um cromossomo normal mais o isocromossomo e a outra contendo apenas um X (**Figura 8.7**).

### *Isodicêntrico*

#### **45,XX,idic(15)(p12)**

Cariótipo feminino com cromossomo 15 isodicêntrico: todo o braço longo e mais uma porção do braço curto até a banda p12 estão duplicados. O indivíduo portador deste cariótipo teria o fenótipo normal se não houvesse o problema da dissomia uniparental do cromossomo 15 (ver Capítulo 11).

#### **46,X,idic(X)(q23)**

Cariótipo feminino com cromossomo isodicêntrico do X: todo o braço curto e mais uma porção do braço longo até a banda q23 encontram-se duplicados.

#### **46,X,idic(Y)(q12)**

Cariótipo masculino com cromossomo Y isodicêntrico: todo o braço curto e mais uma porção do braço longo até a banda q12 encontram-se duplicados (**Figura 8.8**).

### **Anel cromossômico (r)**

O cromossomo em anel ou anel cromossômico é formado quando duas quebras, uma em cada braço cromossômico, provocam a perda das duas porções terminais do mesmo cromossomo. Os fragmentos resultantes são acêntricos – portanto, são perdidos por não se ligarem ao fuso acromático. As extremidades sem telômeros se unem formando uma estrutura circular (**Figura 8.9a**). Este tipo de estrutura apresenta-se bastante instável durante as mitoses. Com o entrelaçamento das cromátides e a ligação em fusos divergentes, pode haver a formação de pontes nucleoplasmáticas (ver Capítulo 17). Ou, ainda, a pressão do fuso pode gerar mais quebras e soldaduras, resultando desde um anel dicêntrico (com o dobro do tamanho do anel original) até produtos totalmente modificados do que seria o cromossomo normal. Caso não ocorra este entrelaçamento, o cromossomo segrega normalmente, dando origem a duas células iguais portadoras do anel (**Figura 8.9b**). O fenótipo de portadores dessa aberração está rela-

**Figura 8.5**

Duplicação 46,xy, dup(7) (q21q22).

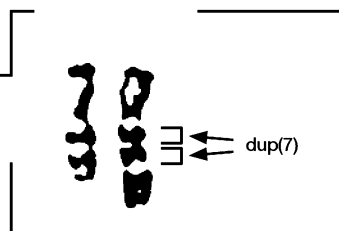
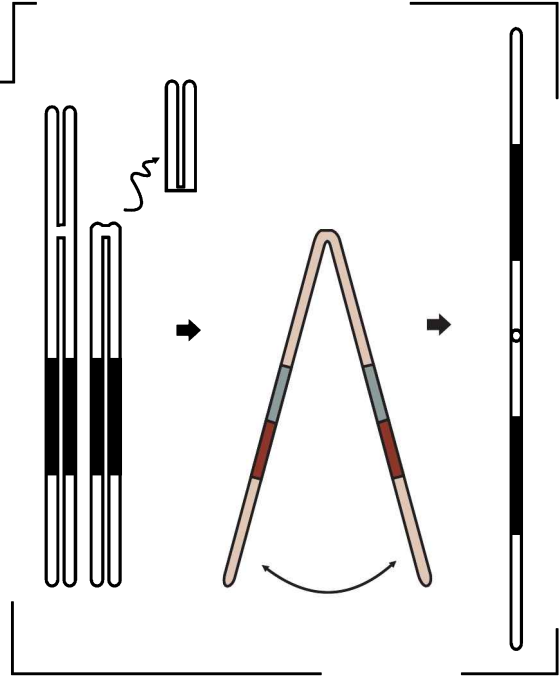


Figura 8.6

Formação do isocromossomo – há quebra e perda do braço curto do cromossomo, seguidas do afastamento de suas cromátides-irmãs, resultando em um cromossomo com duas cópias do mesmo braço (ver Capítulo 14 para outras possibilidades de mecanismo de formação do isocromossomo).



cionado à perda dos genes das extremidades do cromossomo e à instabilidade do anel nas divisões celulares.

### Exemplos

#### 46,XY,r(18)(p11q23)

Cariótipo masculino com cromossomo 18 em anel, onde os pontos de quebra e posterior união ocorreram nas bandas p11 e q23. Os segmentos distais a essas bandas foram perdidos.

#### 46,XX,r(4)(p16q34)

Cariótipo feminino com cromossomo 4 em anel, onde os pontos de quebra e posterior união ocorreram nas bandas p16 e q34. Os segmentos distais a essas bandas foram perdidos (Figura 8.10).

### Alterações balanceadas

As alterações cromossômicas balanceadas caracterizam-se por não haver perda nem ga-

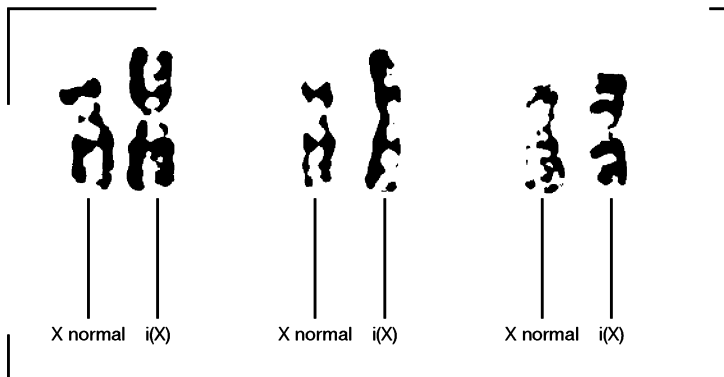
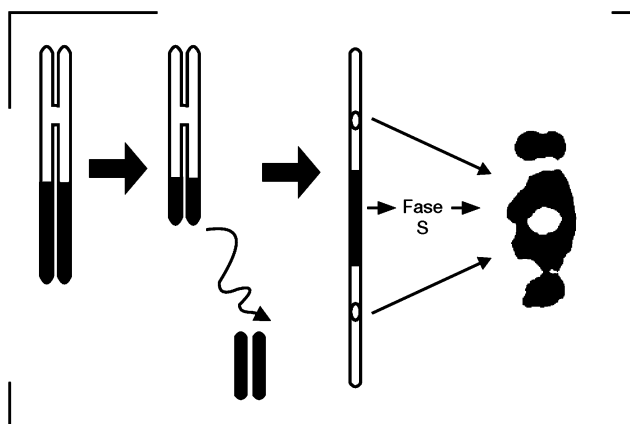


Figura 8.7

Isocromossomo  
46,x, i(X)(q10)  
[23]/45, x[17].

**Figura 8.8**

Esquema de como ocorreu a formação do isocromossomo dicêntrico no Y, comparado com a foto do cromossomo alterado.

nho de material, somente a redistribuição do material a partir de quebras e rearranjos de segmentos cromossômicos. Indivíduos portadores de aberrações deste tipo não possuem nenhuma anormalidade clínica na maioria das vezes, salvo se algum ponto de quebra alterar a expressão de um gene. Dependendo da alteração, pode haver um aumento no risco de abortamentos espontâneos e/ou de a prole apresentar manifestações clínicas provenientes da segregação não balanceada das alterações cromossômicas presentes em um dos pais.

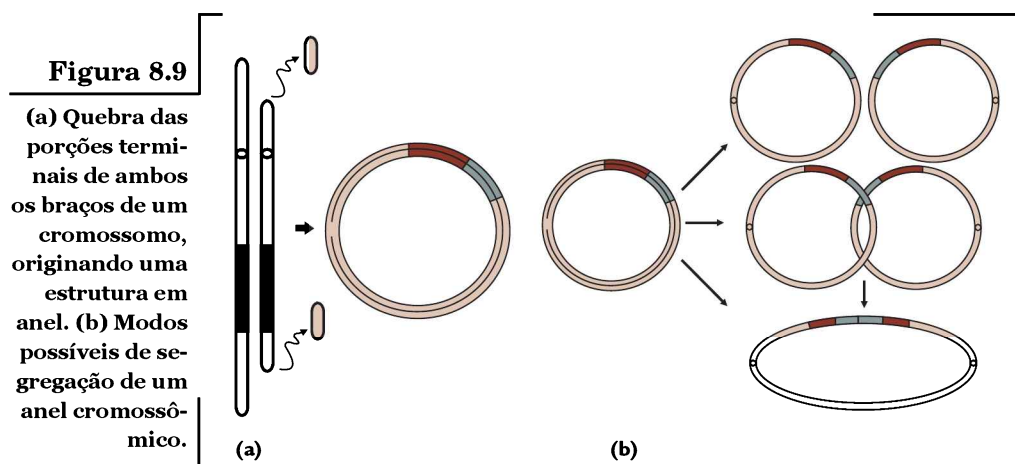
## Inversão (inv)

A inversão é caracterizada por duas quebras no mesmo cromossomo, seguidas de uma

rotação de  $180^\circ$  do segmento cromossômico entre os pontos de quebra, com posterior ligação do segmento invertido. Podemos ter dois tipos de inversão: a paracêntrica e a pericêntrica (**Figura 8.11**).

A inversão paracêntrica tem suas quebras no mesmo braço do cromossomo, não incluindo o centrômero no segmento invertido, enquanto a inversão pericêntrica tem uma quebra em cada braço, de forma que o fragmento invertido inclua o centrômero. Este rearranjo afeta a morfologia do cromossomo.

Na meiose, forma-se uma alça para que o cromossomo invertido possa parear com o seu homólogo, tanto na inversão paracêntrica como na pericêntrica (**Figura 8.12**). Quando ocorre *crossing-over* dentro da alça de inversão, pode haver formação de gametas

**Figura 8.9**

(a) Quebra das porções terminais de ambos os braços de um cromossomo, originando uma estrutura em anel. (b) Modos possíveis de segregação de um anel cromossômico.



desbalanceados. A inversão paracêntrica pode inclusive formar cromossomos dicêntricos e cromossomos acêntricos.

### *Exemplos de inversões paracêntricas*

#### **46,XX,inv(5)(q14q23)**

Cariótipo feminino com inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 5 na porção entre as bandas q14 e q23.

#### **46,XY,inv(14)(q11q32.1)**

Cariótipo masculino com inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 14 na porção entre as bandas q11 e q32.1 (**Figura 8.13**).

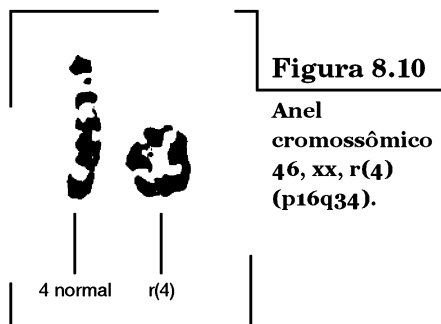
### *Exemplos de inversões pericêntricas*

#### **46,XX,inv(10)(p11q21)**

Cariótipo feminino com inversão pericêntrica no cromossomo 10. Os pontos de quebra ocorreram no braço curto na banda p11 e no braço longo na banda q21.

#### **47,XY,inv(9)(p12q13),+21**

Cariótipo masculino de paciente com síndrome de Down por trissomia livre do cromossomo 21, que apresenta também uma inversão



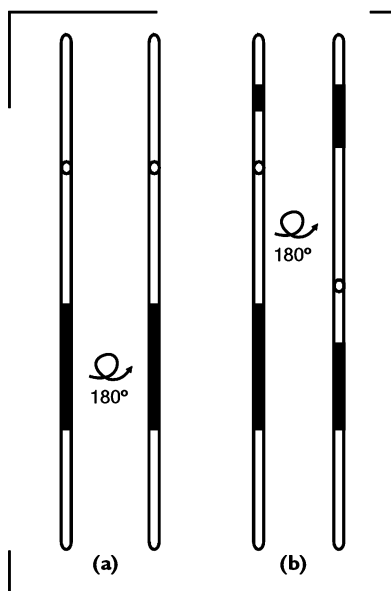
**Figura 8.10**

Anel  
cromossômico  
46, XX, r(4)  
(p16q34).

pericêntrica no cromossomo 9, bastante frequente na população, sendo que os pontos de quebra ocorreram no braço curto na banda p12 e no braço longo na banda q13 (**Figura 8.14**).

### Translocação recíproca (t)

A translocação recíproca é a troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos (**Figura 8.15a.**), sendo o tipo de aberração cromossômica estrutural mais frequentemente encontrado. Devido à maior suscetibilidade de determinadas sequências de DNA, os pontos de quebra estão desi-

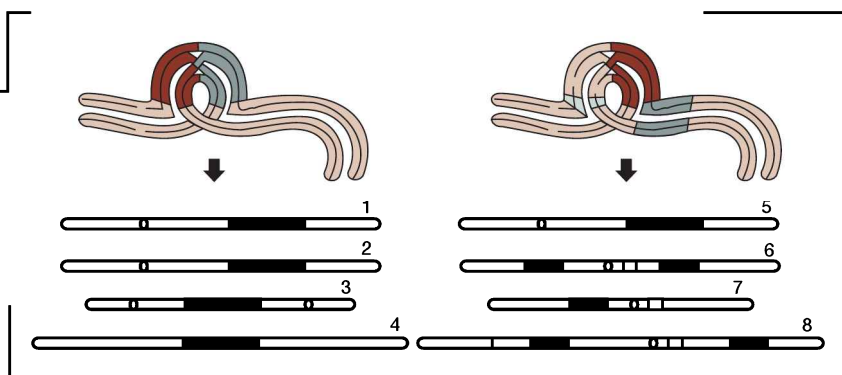


**Figura 8.11**

(a) Na inversão paracêntrica, o segmento resultante de ambas as quebras no mesmo braço do cromossomo gira 180° e volta a se ligar. (b) Na inversão pericêntrica, o segmento resultante de uma quebra em cada braço do cromossomo gira 180° e volta a se ligar.

**Figura 8.12**

**Resultado da meiose de cromossomos invertidos. De 1 a 4: gametas resultantes da inversão paracêntrica. De 5 a 8: gametas resultantes da inversão pericêntrica.**



gualmente distribuídos. Na meiose, para que ocorra o pareamento entre os cromossomos translocados e seus homólogos, uma figura quadrivalente é formada (**Figura 8.15b.**), tendo como resultado a possibilidade de formação de seis tipos diferentes de gametas, sendo que quatro deles são desbalanceados e, dos dois restantes, um é normal e o outro carrega a mesma translocação balanceada do seu progenitor. A viabilidade dos indivíduos formados a partir dos gametas desbalanceados dependerá do tamanho do segmento envolvido na translocação e de quais genes estão presentes nos segmentos envolvidos. A **Figura 8.16** mostra um exemplo de cariótipo da prole de um indivíduo com translocação recíproca.

Devido às inúmeras possibilidades de translocações, os resultados são variáveis, podendo haver trissomias e monossomias parciais de qualquer cromossomo. Também pode ocorrer a segregação dos dois cromossomos normais, assim como dos dois afetados. Neste último caso, o indivíduo apresentará a mesma translocação que seu progenitor.

## Exemplos

### **46,XX,t(22;X)(q11;q26)**

Cariótipo feminino com translocação recíproca entre os cromossomos X e 22. Os pontos de quebra e posterior união ocorreram na banda

q11 do cromossomo 22 e na banda q23 do cromossomo X.

### **46,XY,t(7;14)(p12;q13)**

Cariótipo masculino com translocação recíproca entre os cromossomos 7 e 14. Os pontos de quebra e posterior união ocorreram na banda p12 do cromossomo 7 e na banda q13 do cromossomo 14.

### **46,XX,t(2;18)(q22;q23)**

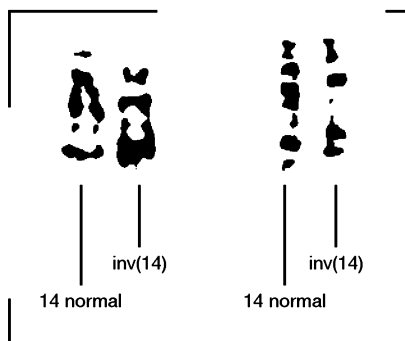
Cariótipo feminino com translocação recíproca entre os cromossomos 2 e 18. Os pontos de quebra e posterior união ocorreram na banda q22 do cromossomo 2 e na banda q23 do cromossomo 18 (**Figura 8.17**).

### **46,XX,t(5;10)(q15;p15)**

Cariótipo feminino com translocação recíproca entre os cromossomos 5 e 10. Os pontos de quebra e posterior união ocorreram na banda q15 do cromossomo 5 e na banda p15 do cromossomo 10 (**Figura 8.18**).

### **46,XY,t(9;14)(p21;q21)**

Cariótipo masculino com translocação recíproca entre as porções do braço curto do cromossomo 9 e do braço longo do cromossomo 14. Os pontos de quebra e posterior união ocorreram na banda p21 do cromossomo 9 e na banda q21 do cromossomo 14. As porções cromossômicas distais a essas bandas foram trocadas entre os cromossomos envolvidos (**Figura 8.19**).

**Figura 8.13**

**Inversão  
paracêntrica  
46, xy, inv(14)  
(q11q32.1).**

## Inserção (ins)

A inserção ocorre quando um segmento de um cromossomo é inserido em outro cromossomo. Pode-se, então, concluir que em um deles deve haver duas quebras para liberar o fragmento e, no outro, apenas uma para que o fragmento possa se inserir. Dependendo de como o fragmento irá se inserir, a aberração em questão pode ser subclassificada em direta ou invertida. Durante a meiose, para que o cromossomo com a inversão possa se parear com seu homólogo e ainda com o segmento de outro cromossomo, formam-se alças, podendo, assim, originar produtos não balanceados. O material adicional também pode ser cedido da cromátide-irmã. Assim, o cromossomo em questão se apresentará assimétrico, e as células-filhas derivadas desta aberração terão a duplicação ou a deleção deste fragmento (**Figura 8.20**).

## Exemplos

### Inserção direta

**46,XX,ins(8;6)(q13;p12p23)**

Cariótipo feminino com inserção direta no cromossomo 8. O segmento do braço curto do cromossomo 6 entre as bandas p12 e p23 foi inserido no braço longo do cromossomo 8 na banda q13. Note que o cromossomo que recebe o segmento é especificado primeiro.

**46,XY,ins(2)(q32;p14p23)**

Cariótipo masculino com inserção direta no cromossomo 2. O segmento do braço curto entre as bandas p14 e p23 foi inserido no braço longo na banda q32.

### Inserção invertida

**46,XX,ins(6;10)(q24;q24q22)**

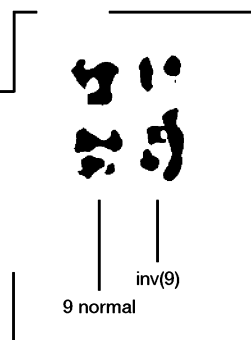
Cariótipo feminino com inserção invertida no cromossomo 6. O segmento do braço longo do cromossomo 10 entre as bandas q24 e q22 foi inserido no braço longo do cromossomo 6 na banda q24.

## Translocação robertsoniana (rob)

A translocação robertsoniana envolve apenas os cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e ocorre a partir da perda dos braços curtos de dois destes cromossomos, seguida de fusão dos centrômeros, unindo os braços longos dos cromossomos acrocêntricos envolvidos (**Figura 8.21a**). A perda dos braços curtos não é prejudicial, uma vez que todos os braços curtos destes cromossomos possuem as mesmas sequências de DNA (RNA ribossômico), e a falta de uma ou mais delas é suprida pelas que estão presentes nos cromossomos acrocêntricos não envolvidos na translocação. Na meiose, a partir do pa-

**Figura 8.14**

**Inversão  
pericêntrica  
47, xy, inv(9)  
(p12q13), +21.**



reamento do cromossomo derivado da translocação robertsoniana com seus homólogos normais, assim como na translocação recíproca, ocorre a formação de seis tipos pos-

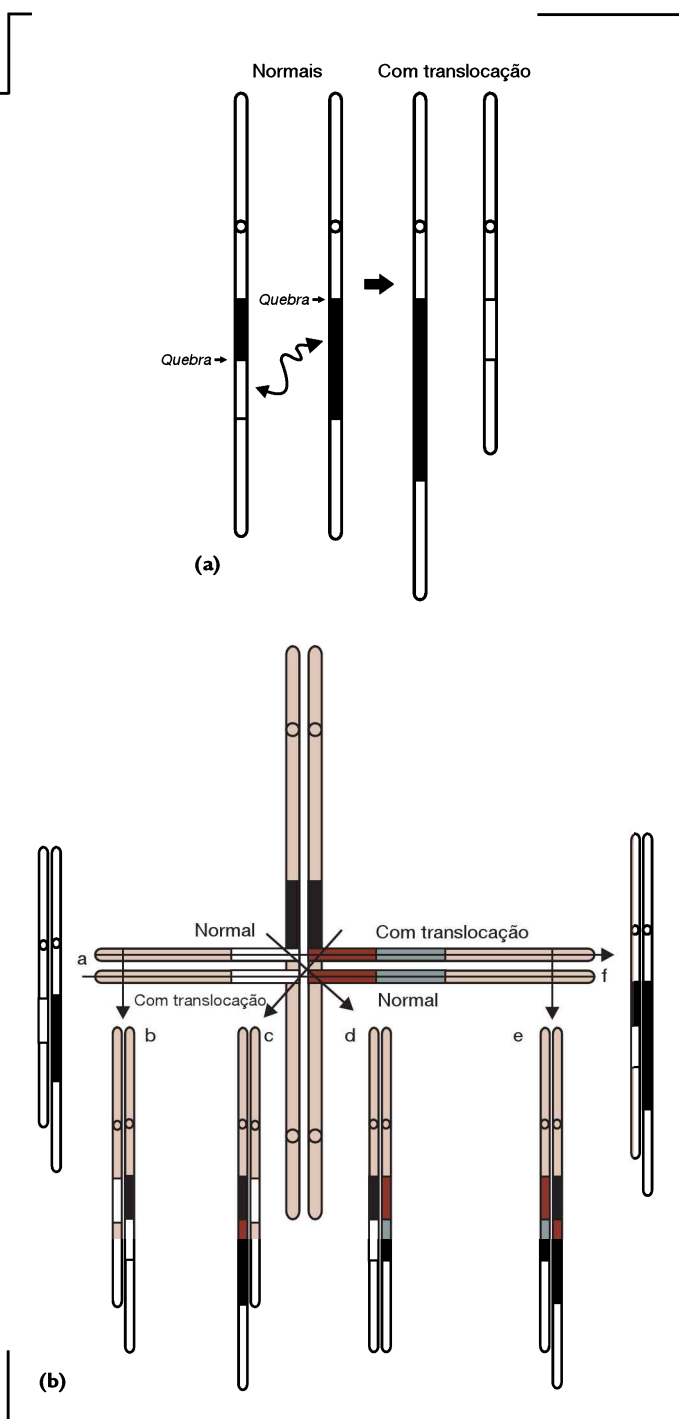
síveis de gametas: um normal, um portador da mesma translocação balanceada do seu progenitor e quatro desbalanceados (**Figura 8.21b.**).

**Figura 8.15**

**(a)** Troca de fragmentos entre dois cromossomos.

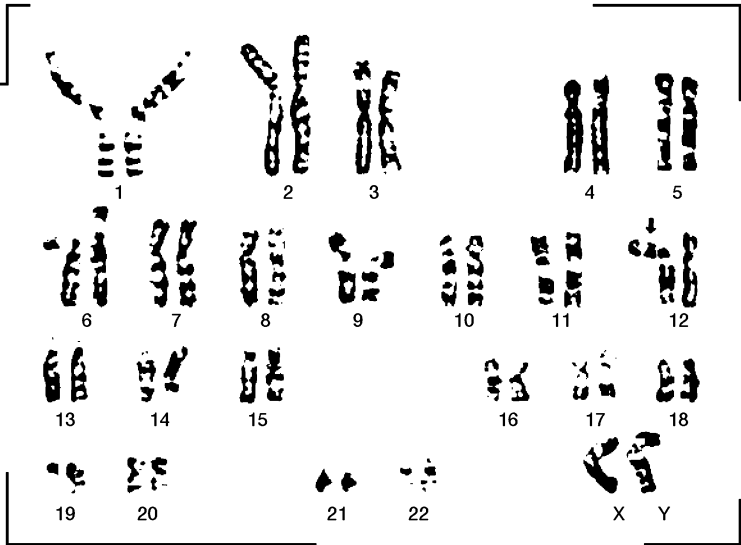
**(b)** Modos possíveis de segregação de uma translocação recíproca. Note a formação de uma figura quadrivalente, da qual poderão surgir diferentes combinações de gametas.

Note também que, das seis possibilidades de gametas, um é normal, um possui a mesma translocação recíproca balanceada e os outros quatro são desbalanceados.



**Figura 8.16**

Este cariótipo é um exemplo de segregação da translocação recíproca. Um dos pais deste indivíduo possui uma translocação entre os cromossomos 6 e 12 e transmitiu o cromossomo 6 normal, juntamente com o cromossomo 12 afetado. O resultado disto é uma trissomia parcial de 6p e monossomia parcial de 12p.



### Exemplos

(Alternativamente ao símbolo “rob”, pode-se utilizar o símbolo “der”, de cromossomo derivado.)

**45,XX,der(13;14)(q10;q10)**

**45,XX,rob(13;14)(q10;q10)**

Cariótipo feminino com translocação robertsoniana entre os cromossomos 13 e 14. A banda q10 é utilizada para designar o centrômero como ponto de quebra e a presença do braço longo inteiro. O portador dessa alteração não possui fenótipo alterado, já que o cromossomo derivado da translocação é formado pelos dois braços longos inteiros do 13 e do 14 (**Figura 8.22**).

**45,XY,der(14;21)(q10;q10)**

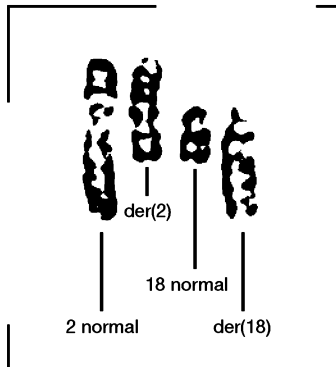
**45,XY,rob(14;21)(q10;q10)**

Cariótipo masculino com translocação robertsoniana entre os cromossomos 14 e 21. Essa é a translocação robertsoniana mais frequentemente encontrada. O portador dessa alteração não possui fenótipo alterado, já que o cromossomo derivado da translocação é formado pelos dois braços longos inteiros do 14 e do 21 (**Figura 8.23**).

**46,XX,der(21;21)(q10;q10),+21**

**46,XX,rob(21;21)(q10;q10),+21**

Cariótipo feminino com translocação robertsoniana entre dois cromossomos 21, em paciente com síndrome de Down por translo-

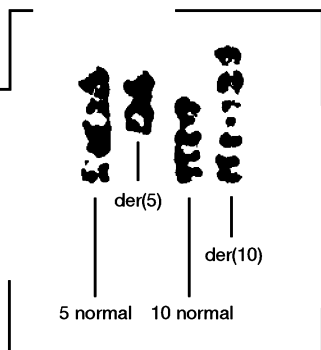


**Figura 8.17**

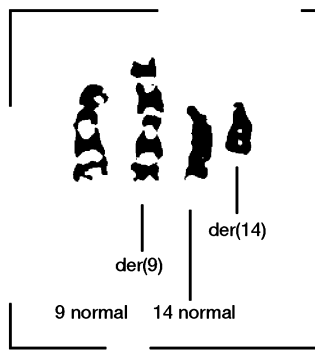
Translocação recíproca 46, xx, t(2;18)(q22;q23).

**Figura 8.18**

Translocação  
recíproca 46,  
xx, t(5;10)  
(q15;p15).

**Figura 8.19**

Translocação  
recíproca 46,  
xy, t(9;14)  
(p21;q21).



cação robertsoniana. Além do cromossomo derivado de dois braços longos do 21, está presente mais um cromossomo 21 normal (**Figura 8.24**).

**45,XY,der(13;21)(q10q10)**

**45,XY,rob(13;21)(q10q10)**

Cariótipo masculino com translocação robertsoniana entre os cromossomos 13 e 21. O portador dessa alteração não possui fenótipo alterado, já que o cromossomo derivado da translocação é formado pelos dois braços longos inteiros do 13 e do 21. É interessante relatar

o resultado desta translocação em particular, pois tanto a trissomia 13 quanto a trissomia 21 são compatíveis com a vida. Sendo assim, o indivíduo portador terá chances aumentadas de um filho com as síndromes de Patau e Down.

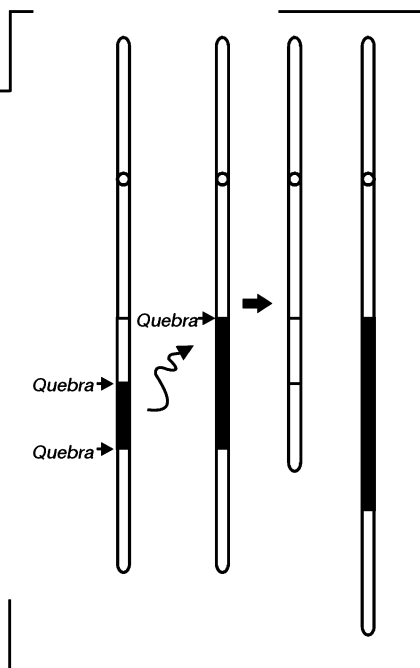
**45,XX,der(13;13)(q10q10)**

**45,XX,rob(13;13)(q10q10)**

Este indivíduo só produz gametas com o derivado de dois braços longos de 13 ou nulissômico para este cromossomo, inviabilizando a sua prole, que, se sobreviver, terá síndrome de Patau.

**Figura 8.20**

Esquema de como ocorre a inserção, mostrando os pontos de quebra.



### Translocação de braço inteiro

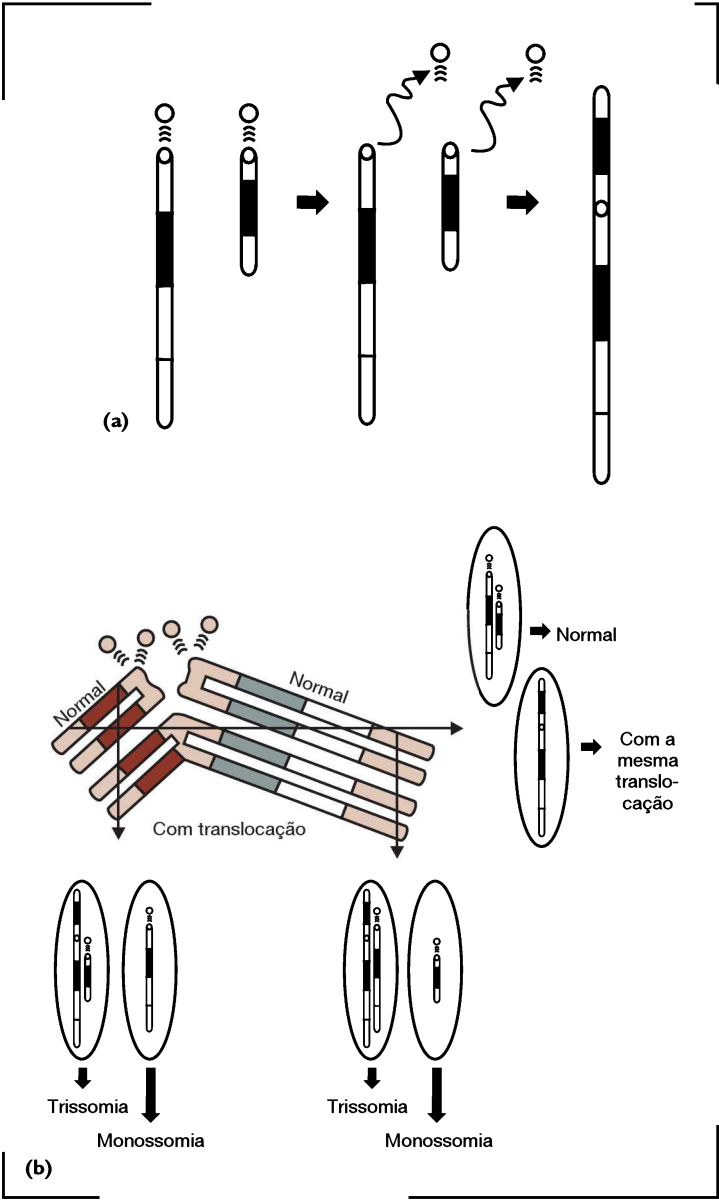
Translocações de braço inteiro são translocações recíprocas nas quais os pontos de quebra estão nos centrômeros. Neste tipo de translocação, ocorre a troca de braços inteiros entre cromossomos. Pode ocorrer tanto a fusão de braço curto com braço longo, quanto as fusões entre braços curtos e entre braços

longos, como se pode observar nos exemplos a seguir (**Figura 8.25**).

### Exemplos

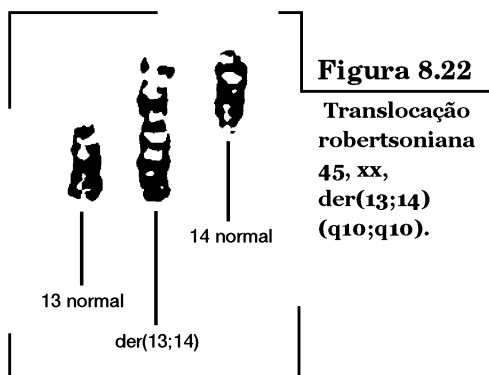
**47,XY,t(12;21)(q10p10),+21**

Cariótipo masculino com uma translocação recíproca de braço inteiro entre os cromosso-



**Figura 8.21**

(a) Translocação robertsoniana, com perda dos braços curtos. (b) Modos possíveis de segregação de uma translocação robertsoniana. Note que, das seis possibilidades de gametas, um é normal, um possui a mesma translocação balanceada e os outros quatro são desbalanceados.

**Figura 8.22**

**Translocação robertsoniana**  
**45, XX,**  
**der(13;14)**  
**(q10;q10).**

mos 12 e 21. Os pontos de quebra ocorreram na região do centrômero, onde o braço longo do cromossomo 12 foi unido ao braço longo do cromossomo 21 e, consequentemente, os braços curtos de ambos se uniram. Devido a uma segregação não balanceada, este indivíduo possui a síndrome de Down (**Figura 8.26**).

#### **46,XX,t(17;X)(q10p10)**

Cariótipo feminino com uma translocação recíproca de braço inteiro entre os cromossomos 17 e X. Os pontos de quebra ocorreram na região do centrômero, onde o braço longo do cromossomo 17 foi unido ao braço curto do cromossomo X, e o braço curto do cromossomo 17 foi unido ao braço longo do cromossomo X (**Figura 8.27**).

### **Translocação complexa**

Translocações complexas são translocações recíprocas com a participação de três cromossomos ou mais.

#### **Exemplos**

#### **46,XX,t(5;22;12)(q23;q12;q21)**

O segmento do cromossomo 5 distal à banda q23 foi translocado para o cromossomo 22 na banda q12. O segmento do cromossomo 22 distal à banda q12 foi translocado para o cromossomo 12 na banda q21, sendo que o segmento do cromossomo 12 distal a essa banda foi translocado para o cromossomo 5 na banda q23. Note que, na translocação complexa, a ordem dos cromossomos está de acordo com a sequência de transferências de segmentos cromossômicos e não mais em ordem crescente.

#### **46,XY,t(1;7;6;8)(p22;q36;q23;q24)**

O segmento do cromossomo 1 distal à banda p22 foi translocado para o cromossomo 7 na banda q36; o segmento do cromossomo 7 distal à banda q36 foi translocado para o cromossomo 6 na banda q23; o segmento do cromossomo 6 distal à banda q23 foi translocado para o cromossomo 8 na banda q24, e o segmento do cromossomo 8 distal à banda q24 foi translocado para o cromossomo 1 na banda p22 (**Figura 8.28**).

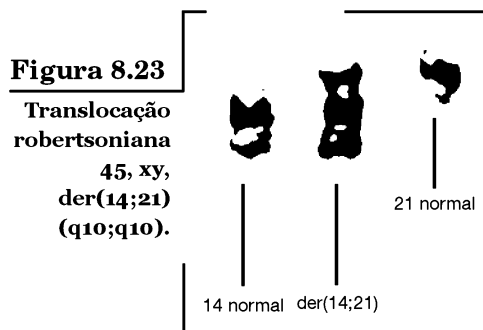
### **Translocação com origem definida e destino aleatório ou *jumping translocation***

Este é um evento citogenético muito raro em que o mesmo segmento doado por um cromossomo é recebido por diferentes cromossomos, em diferentes clones de células. Isso ocorre principalmente em células neoplásicas. Os cromossomos que recebem o segmento têm uma distribuição aleatória, variando de um paciente para outro; já o segmento que participa da translocação em todos os clones não é randômico e pode estar relacionado ao diagnóstico da neoplasia.

#### **Exemplo**

#### **46,XY,t(3;7)(p26;q32)** **[8]/46,XY,t(7;9)(q32;q34)** **[7]/46,XY,t(7;14)(q32;q32)[5]**

Três translocações clonais envolvendo a porção distal à banda q32 do cromossomo 7. Este segmento está translocado para as bandas terminais dos cromossomos 3, 9 e 14.

**Figura 8.23**

**Translocação robertsoniana**  
**45, xy,**  
**der(14;21)**  
**(q10;q10).**



Outras alterações e nomenclaturas utilizadas

Material adicional de origem desconhecida (add)

O material adicional de origem desconhecida é utilizado para descrever um cromossomo, no cariótipo, que apresenta um segmento anormal de origem desconhecida a mais. Este segmento pode ser formado por uma inserção, uma translocação ou, ainda, uma duplicação, mas em uma primeira análise costuma ser descrito como um material adicional. Após investigações complementares com técnicas específicas (como por exemplo FISH e CGH – ver Capítulos 28 e 29), pode-se descobrir a origem do material adicional.

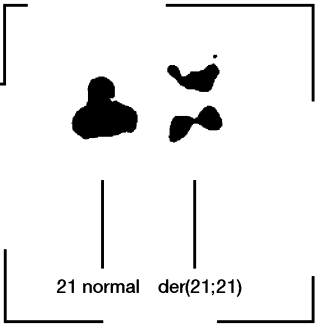
Exemplo

46,XX,add(9)(p22)

Cariótipo feminino com material adicional de origem desconhecida anexado à banda p22 do cromossomo 9 (**Figura 8.29**).

Figura 8.24

Translocação robertsoniana  
46, xx,  
der(21;21)  
(q10;q10),+21.



Cromossomo marcador (mar)

O cromossomo marcador é um cromossomo estruturalmente anormal que não pode ser identificado por técnicas de bandeamento convencionais. De origem desconhecida, ele aparece como um cromossomo adicional no cariótipo, podendo ou não estar presente em todas as células.

Exemplos

47,XY,+mar

Cariótipo masculino contendo um cromossomo marcador.

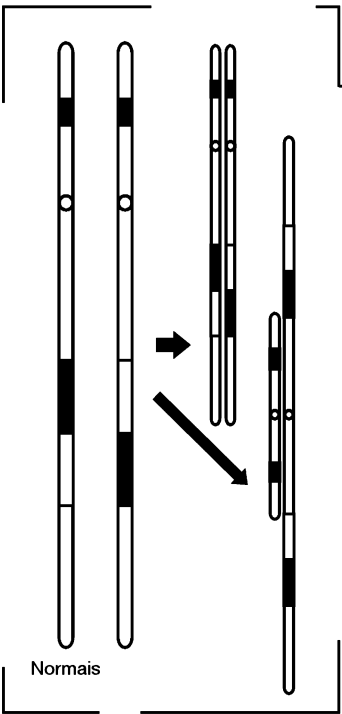
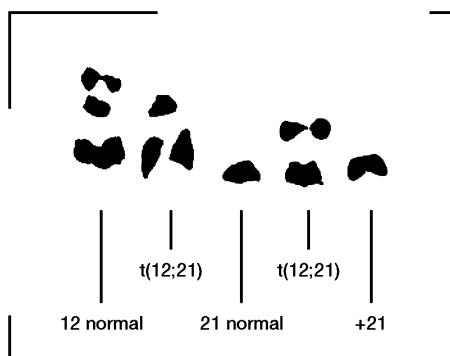


Figura 8.25

Resultados possíveis nos casos de translocação de braço inteiro. Note que pode haver tanto a junção de braço curto com longo, quanto a junção de braço curto com curto e de longo com longo.

**Figura 8.26**

Translocação  
de braço inteiro  
47,XY,t(12;21)  
(q10p10),+21.

#### 48,XX,+2mar

Cariótipo feminino contendo dois cromossomos marcadores.

### Cromossomo derivado (der)

O cromossomo derivado resulta do rearranjo estrutural abrangendo um ou mais cromossomos, ou ainda de mais de um rearranjo sobre o mesmo cromossomo. O termo sempre se refere ao cromossomo que tem um centrômero intacto, presente na estrutura observada. Pode-se dizer que o cromossomo derivado é um cromossomo marcador com a origem do centrômero conhecida, ou seja, um cromossomo estruturalmente alterado, que deriva de um cromossomo conhecido.

### Exemplos

#### 46,XY,der(5)add(5)(p15)

Cariótipo masculino com cromossomo 5 derivado com material adicional de origem desco-

nhecida anexado ao braço curto do cromossomo 5 na banda p15.

#### 46,X,der(X)

Cariótipo feminino com um dos cromossomos X alterado. Um cromossomo marcador foi testado com sonda centromérica de X (ver Capítulo 28) e foi definido como cromossomo derivado de X.

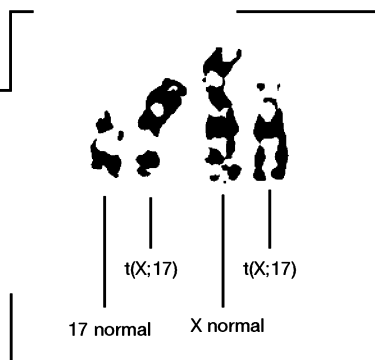
#### 45,XY,der(10)t(10;22)(q26q11),-22

Cariótipo masculino com cromossomo 10 derivado que substitui um cromossomo 10 normal. Este cariótipo apresenta somente um cromossomo 22 normal. Provavelmente o cromossomo perdido seja um cromossomo 22 derivado resultante da translocação 10;22.

#### 46,XX,der(12)t(6;12)(p21p13)

Cariótipo feminino com cromossomo 12 derivado resultante da translocação do braço curto do cromossomo 6 na banda p21 com o braço curto do cromossomo 12 na banda p13. O cromossomo 12 derivado substitui um cromossomo 12 normal. O cariótipo é

**Figura 8.27**  
Translocação de braço  
inteiro 46,XX,t(17;X)  
(q10p10).



desbalanceado com perda de material de cromossomo 12 e ganho de material de cromossomo 6.

#### 46,XX,der(12)t(12;?)(q21;?)

Cariótipo feminino com cromossomo 12 derivado resultante de uma translocação com cromossomo de origem desconhecida. O cromossomo derivado de 12 substitui um cromossomo 12 normal, apresentando um padrão de bandas atípico (**Figura 8.30**).

## Cromossomos dicêntricos (dic)

Cromossomos dicêntricos são cromossomos que apresentam dois centrômeros. As possibilidades de formação destas estruturas são variadas. Obrigatoriamente, tem que haver mais de uma quebra e soldadura de dois segmentos cromossômicos com centrômeros. A presença de dois centrômeros pode ser detectada com precisão utilizando-se a técnica de bandeamento C (ver Capítulo 6) ou a técnica de FISH com sonda centromérica (ver Capítulo 28). Cromossomos dicêntricos podem formar pontes nucleoplasmáticas entre os núcleos-filhos, após a divisão celular (ver Capítulo 17).

## Exemplos

#### 45,XY,dic(10;17)(q23q21)

Cromossomo dicêntrico formado pelos cromossomos 10 e 17 com perda dos segmentos terminais dos braços longos, a partir de 10q23 e 17q21, respectivamente. O número total de 45 cromossomos está explicado pelo fato de dois cromossomos estarem fusionados.

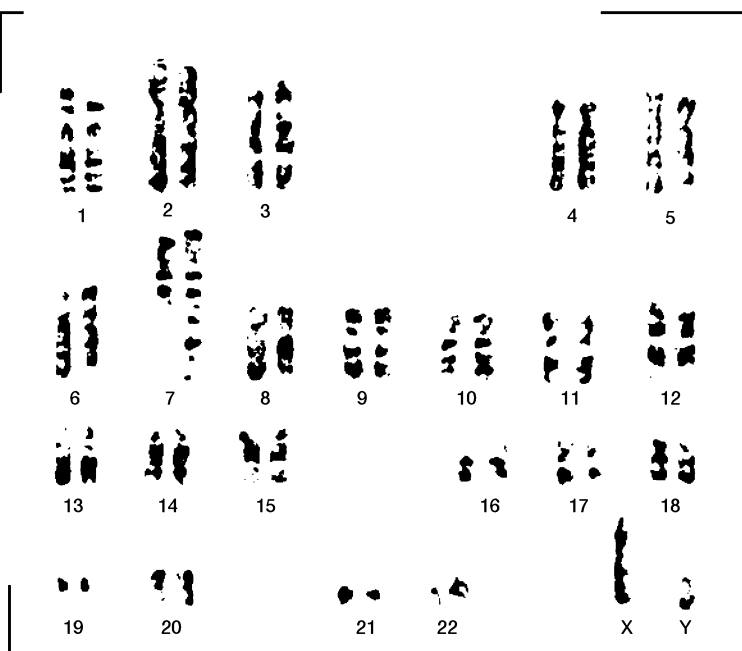
#### 45,XX,dic(15)(q21q23)

Cromossomo dicêntrico originado pela quebra e posterior união das cromátides-irmãs do mesmo cromossomo 15, com perda das porções terminais a partir de q21 para um dos braços do 15 e q23 para o outro braço. Note que nenhum cromossomo 15 normal está presente nesse cariótipo.

## Regiões homogeneamente coradas (hsr)

Um cromossomo contendo uma banda anormalmente aumentada e uniformemente corada caracteriza esse tipo de aberração. Facilmente observada com a técnica de ban-

**Figura 8.28**  
Translocação complexa  
46,XY,t(1;7;6;8)  
(p22;q36;q23;q24).



deamento G, a banda em questão apresenta uma coloração com um grau de intensidade intermediário. O material adicional provém de amplificações gênicas, ou seja, várias cópias de uma mesma região cromossômica. Isso é encontrado em tumores e células expostas a drogas. Esta aberração é passada de célula-mãe para célula-filha, podendo sofrer mudanças estruturais ou reagir com o ambiente. Dessa forma, a região pode aumentar ou diminuir de comprimento.

## Exemplos

### 46,XY,hsr(5)(q34)

Cariótipo masculino contendo a banda q34 aumentada e homogeneamente corada.

### 46,XX,hsr(X)(p21)

Cariótipo feminino contendo a banda p21 aumentada e homogeneamente corada.

### 46,XX,t(3;8)(q13;p12),hsr(1)(q34)

Cariótipo feminino contendo translocação entre o braço longo do 3 e o braço curto do 8, e ainda com a banda q34 do cromossomo 1 aumentada e homogeneamente corada (**Figura 8.31**).

## Double minutes (dmin)

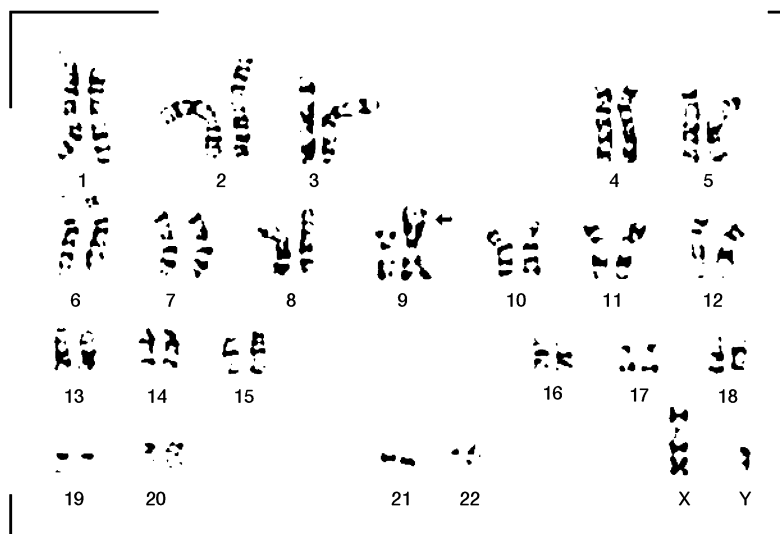
Os *double minutes* (DMs) são estruturas cromossômicas acêntricas pequenas que ocor-

rem em pares. Assim como as regiões homogeneamente coradas, os DMs consistem em amplificações do genoma, mas que aparecem externas ao cromossomo, como inúmeros pontos de material cromossômico, circundando os cromossomos habituais e corados, pela técnica tradicional, da mesma forma que elas. Quando observados ao microscópio eletrônico, apresentam a estrutura da cromatina igual à de cromossomos normais, o que confirma a origem dos DMs. Estudos têm demonstrado a falta de telômeros, o que faz sugerir que estas pequenas estruturas são circulares. Também se observa a falta de centrômeros usando técnicas de bandeamento C e anticorpos anticentrocômero, ou ainda pelo simples fato de os DMs não se ligarem ao fuso acromático. Entretanto, durante a mitose, alguns podem ser carregados para as células-filhas por estarem ligados aos cromossomos, mas a maioria é perdida, dando origem a micronúcleos (ver Capítulo 17), sendo desta forma que o número de DMs se torna altamente variado. Pelas normas internacionais de nomenclatura,<sup>1</sup> os DMs não devem ser incluídos no número cromossômico do cariótipo e sua identificação não deve ser precedida do sinal mais “+”.

## Exemplos

### 50,XY,...,+4mar,3dmin

Cariótipo masculino com quatro cromossomos marcadores que possuem centrômero e três amplificações acêntricas.

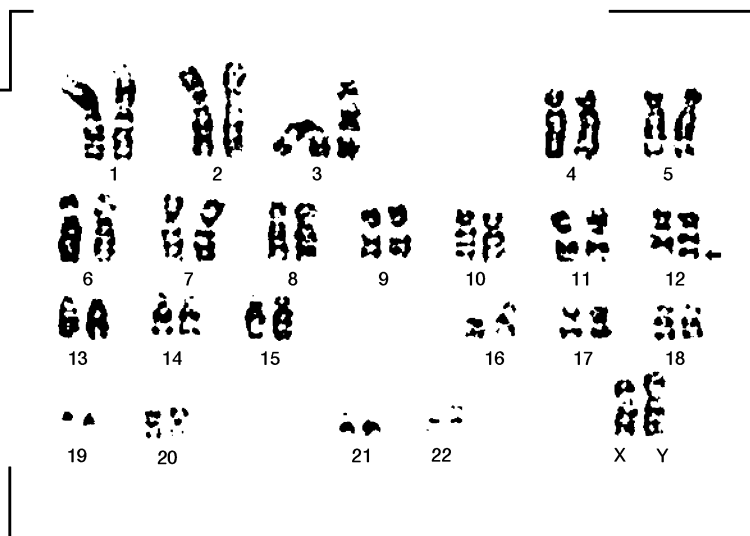


**Figura 8.29**

Material adicional de origem desconhecida  
46,XX,add(9)(p22).

**Figura 8.30**

Cromossomo derivado 46,XX,der(12)t(12;?)(q21;?). Cariótipo feminino com cromossomo 12 derivado de origem desconhecida.



### 52,XX,...,+6mar,70~80dmin

Cariótipo feminino com seis cromossomos marcadores que possuem centrômero e de 70 a 80 ampliações acêntricas (**Figura 8.32**).

## Neocentrômeros

Cromossomos neocentrômeros são alterações cromossômicas raras, muitas vezes consideradas cromossomos marcadores por apresentarem origem desconhecida. Eles não apresentam DNA alfa-satélite e são caracterizados por formarem centrômeros funcionais em regiões onde esta estrutura não está presente, pois se ligam a proteínas centroméricas essenciais, tornando-se estáveis durante as mitoses e meioses. Em geral, os cromossomos neocentrômeros podem ser formados por deleções cromossômicas terminais, deleções cromossômicas intersticiais (paracêntricas ou pericêntricas) ou, ainda, por duplicações invertidas.<sup>3</sup>

Nas deleções intersticiais pericêntricas, há remoção da porção cêntrica, a qual normalmente forma um anel cromossômico, e união das porções distais do cromossomo sem centrômero (**Figura 8.33a**). As deleções in-

tersticiais paracêntricas formam-se a partir da remoção de uma porção intermediária sem centrômero do cromossomo, com união da porção cêntrica com a distal (**Figura 8.33b**).

Através de duplicações invertidas, como o nome sugere, a porção acêntrica é duplicada e posteriormente invertida. Esta formação se dá de maneira similar a um isocromossomo (**Figura 8.33c**), onde normalmente a porção distal do cromossomo está envolvida, podendo resultar em tetrassomia ou trissomia da região duplicada, sendo esta última associada a deleções cromossômicas, algumas vezes terminais. Duplicações invertidas dão origem a cariótipos desbalanceados (**Figura 8.34**). Rearranjos lineares e cromossomos em anel, formados após deleções cromossômicas, dão origem a cariótipos balanceados.

## Exemplos

### Cromossomo neocentrômero

#### 47,XX,+der(6)(qter → q22:)

Cariótipo feminino com cromossomo neocentrômero originado da quebra da porção terminal do cromossomo 6 na banda q22.

**Figura 8.31**

Região homogeneamente corada 46,XX,t(3;8)(q13;p12),hsr(1)(q34).

#### **Cromossomo neocentrômero com deleção intersticial pericêntrica**

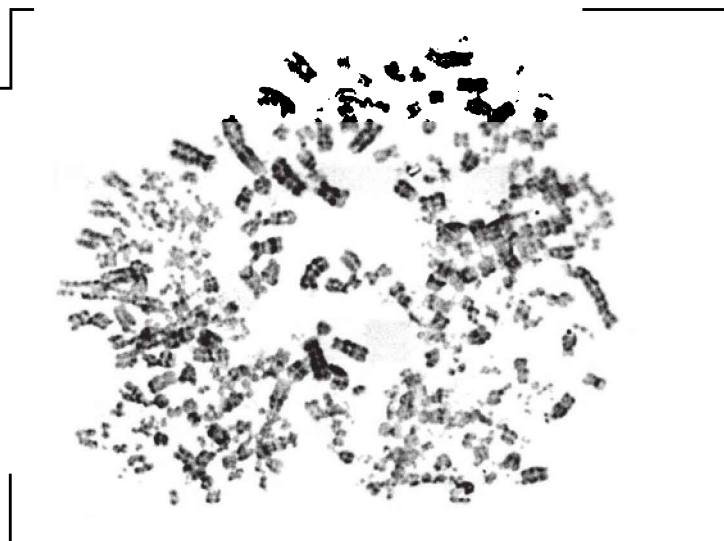
**47,XX,der(4):(p15 → q25:),+neo(4)(pter → p15::q25 → q31 → neo → q31 → qter)**

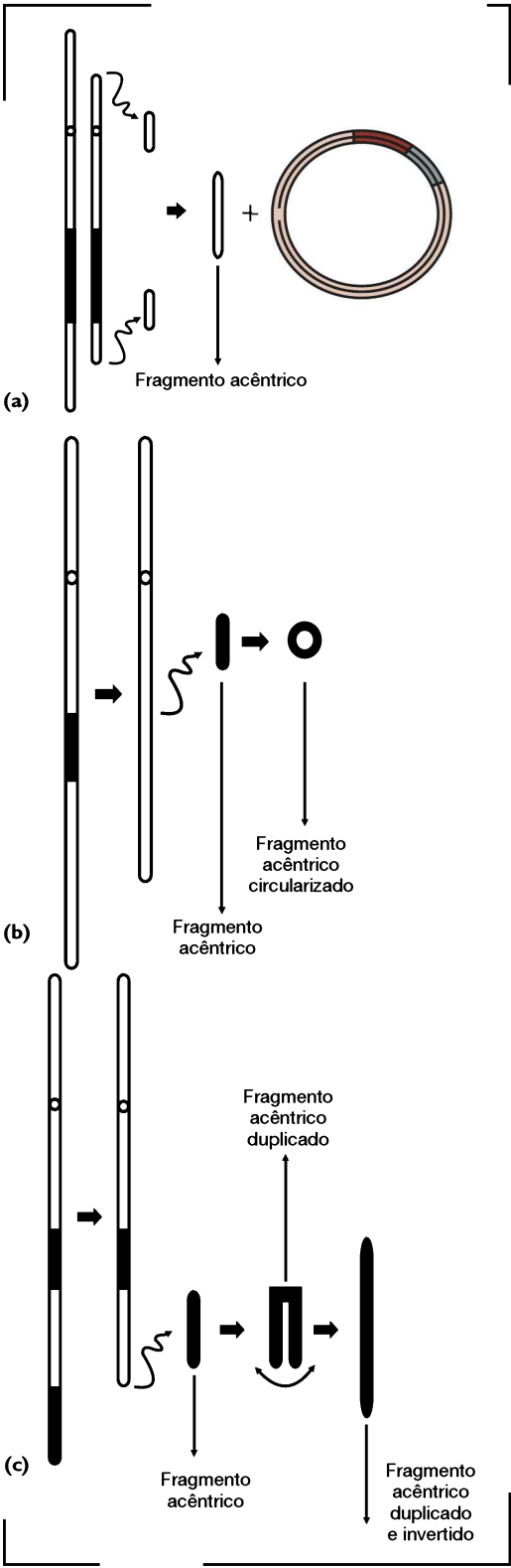
Cariótipo feminino com um cromossomo contendo centrômero, onde os pontos de quebra ocorreram entre as bandas p15 e q25

do cromossomo 4, com a formação de um cromossomo com neocentrômero originado da união da porção terminal do braço curto a partir da banda p15 com a porção terminal do braço longo a partir da banda q25. Neste, a ativação do neocentrômero aconteceu na banda q31.

**Figura 8.32**

*Double minutes*  
52,XX,...,+6mar,  
70~80dmin.



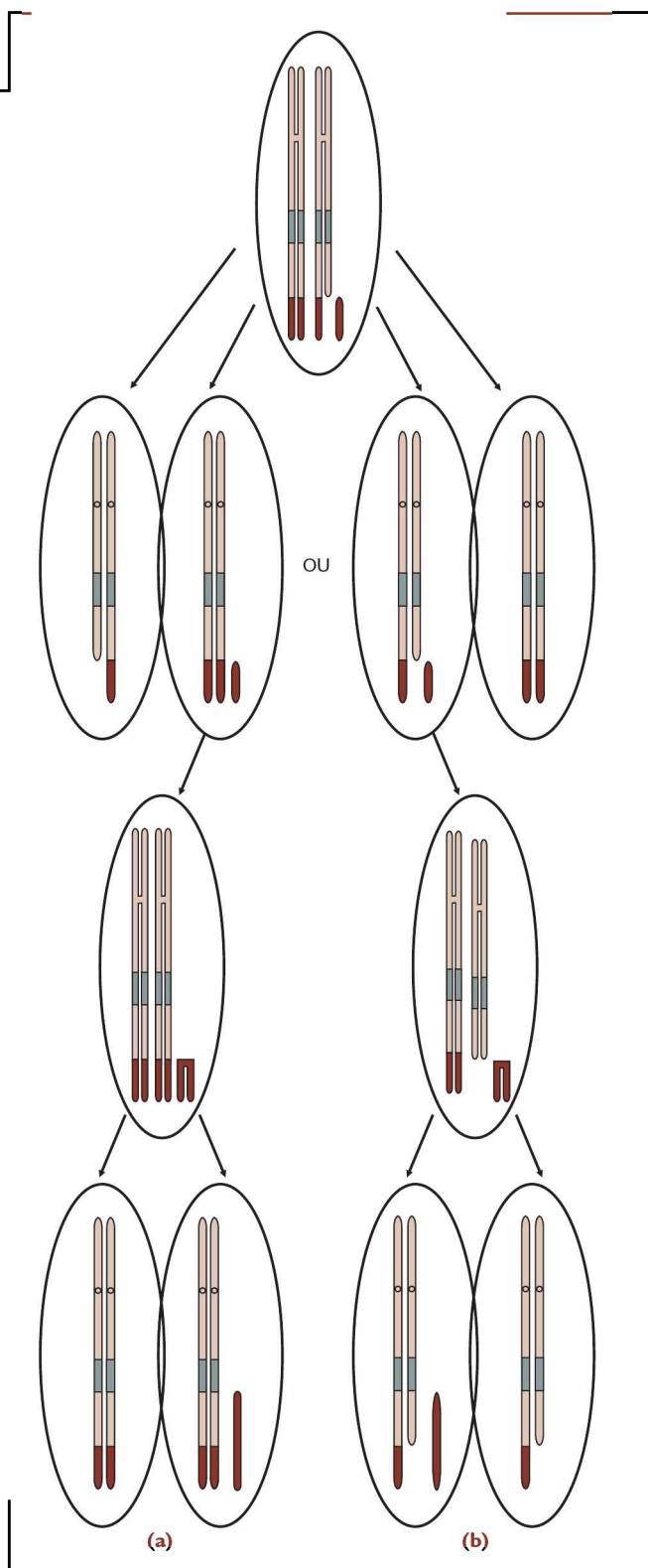


**Figura 8.33**

(a) Deleção intersticial pericêntrica, resultando na formação de um anel cromossômico, e união das porções acêntricas, resultando em um cromossomo marcador com neocentrômero. (b) Deleção intersticial paracêntrica, resultando na formação de um cromossomo com uma deleção mais um marcador com neocentrômero. (c) Duplicação invertida, onde o marcador formado é duplicado e posteriormente invertido.

**Figura 8.34**

Segregação do neocentrômero formado por duplicação invertida em sucessivas mitoses, podendo dar origem a células com tetrassomia (a) ou trissomia (b) do fragmento em questão.





**Cromossomo neocentrômero com deleção intersticial paracêntrica**

**47,XY,der(2)(q21::q33),+neo(2)(:q21 → q33: → q24 → neo → q24)**

Cariótipo masculino com um cromossomo contendo centrômero, onde os pontos de quebra ocorreram entre as bandas q21 e q33 do cromossomo 2. A porção terminal a partir da banda q33 se uniu com o fragmento cêntrico na banda q21, e um cromossomo com neocentrômero foi originado do fragmento removido entre estas bandas. Neste, a ativação do neocentrômero aconteceu na banda q24.

**Cromossomo neocentrômero com duplicação invertida**

**47,XY,+inv dup(8)(q23qter)**

**47,XY,+inv dup(8)(qter → q23::q23 → qter)**

**47,XY,+inv dup(8)(qter → q23::q23 → q24 → neo → q24 → qter)**

Cariótipo masculino com cromossomo neocentrômero originado da duplicação invertida da porção terminal, a partir da banda q23 do cromossomo 8. Neste, a ativação do neocentrômero aconteceu na banda q24.

---

**Referências**

1. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. ISCN 2009 an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 2009.
2. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed., rev. and expand. Berlin; New York: de Gruyter; 2003.
3. Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KH. Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. Am J Hum Genet. 2008 Feb;82(2):261-82.

Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

## Alterações dos cromossomos sexuais

### Cromossomos sexuais

O par de cromossomos sexuais é composto pelos cromossomos X e Y, os quais, diferentemente dos pares de autossomos, se distinguem quanto ao tamanho, à forma e à posição do centrômero e ao conteúdo gênico (**Figura 9.1**).

Acredita-se que evolutivamente os cromossomos X e Y tenham se originado a partir de um par de cromossomos homólogos ancestrais. Durante a evolução dos mamíferos, esses cromossomos teriam perdido suas homologias em decorrência da diminuição progressiva da capacidade de recombinação entre eles, o que acarretou em uma degeneração progressiva do cromossomo Y. À medida que foram se especializando, os cromossomos sexuais X e Y foram acumulando genes relacionados à diferenciação e à função sexual.

O cromossomo X humano representa aproximadamente 5% do genoma haploide, e seu conteúdo gênico está bastante conservado nas diferentes espécies de mamíferos placentários. Para assegurar a compensação de dose devido às diferenças de conteúdo gênico entre os cromossomos X e Y, a maioria dos genes do X de um dos cromossomos X nas mulheres está sujeita à inativação. O cromossomo X é um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio e apresenta cerca de 1.500 genes. Entre esses genes, há vários relacionados à função gonadal e hormonal, como o gene do receptor androgênico. Há também genes que determinam características independentes do sexo, como o gene da distrofina (gene *DMD*) e o gene do fator VIII da coagulação (gene *F*).

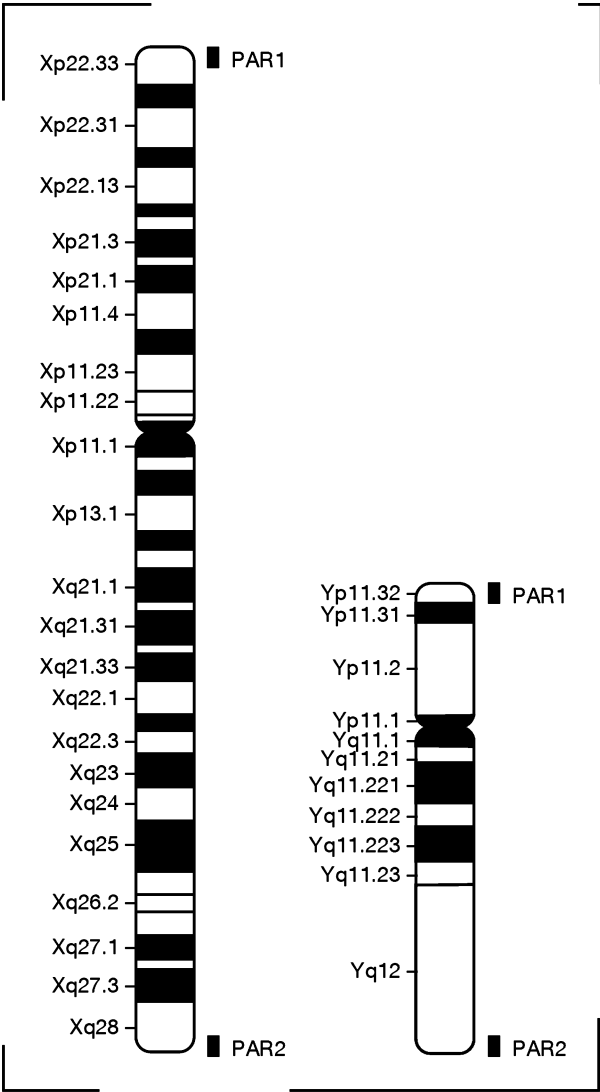
No cromossomo X existem ainda vários genes relacionados ao desenvolvimento mental, entre eles o gene *FMR1*. Cerca de um terço do cromossomo X contém elementos repetitivos LINE1.

Por outro lado, o Y é um cromossomo muito menor, representando aproximadamente 2% do genoma haploide, sendo que mais da metade de seu braço longo é constituída por uma região heterocromática geneticamente inerte, com somente sequências repetitivas. O cromossomo Y é um acrocêntrico que, diferente dos demais cromossomos acrocêntricos humanos, não apresenta regiões organizadoras de nucléolo em seu braço curto. Esse cromossomo contém cerca de 300 genes, vários deles relacionados com a determinação e o desenvolvimento sexual.

No braço curto do cromossomo Y, na banda Yp11.31, está localizado o gene *SRY* (*sex-determining region Y*), principal gene responsável pela determinação gonadal e formação testicular. A descoberta do fator determinante testicular teve seu início a partir de 1959, quando foram descritas as diferentes aneuploidias dos cromossomos sexuais, as quais revelaram que, na presença do cromossomo Y, independente do número de cromossomos X, há a formação do testículo. Subsequentemente, os estudos das alterações estruturais do cromossomo Y, incluindo isocromossomos de braço longo e de braço curto e isodicêntricos de Y, e de sua relação com o fenótipo gonadal indicaram que a região responsável pelo desenvolvimento testicular estava localizada na porção distal de Yp, próxima à região pseudoautossômica. A localização de gene *SRY* foi auxiliada pelo estudo de pacientes com reversão sexual, isto é, aqueles

com fenótipo gonadal não condizente com o cariótipo, entre eles homens com cariótipo 46,XX e mulheres com cariótipo 46,XY com Y aparentemente normal sob bandejamento G. Os estudos moleculares desses pacientes, utilizando sondas para diferentes regiões do Y, revelaram as regiões do Y translocadas para um dos cromossomos X nos homens 46,XX e as regiões do Y ausentes nas mulheres XY, estreitando-se a região candidata do Y que conteria o fator determinante testicular. Nessa região, foi identificado o gene *SRY* que codifica um fator de transcrição responsável pela sinalização para que a gônada indiferenciada seja transformada em testículo.

No cromossomo Y há também vários genes relacionados à espermatogênese. O fator da azoospermia, denominado fator AZF, foi identificado como parte de três regiões distintas de Yq11, denominadas AZFa, AZFb, e AZFc, cujas deleções resultam em azoospermia. Há pelo menos 14 genes localizados nessas regiões que codificam proteínas que se expressam nos testículos e devem ter um papel na espermatogênese e na fertilidade masculina. O *locus* para suscetibilidade ao gonadoblastoma (GBY) está localizado no Y, uma vez que as mulheres com gônadas disgenéticas na presença de material do cromossomo Y apresentam um maior risco de desenvolver



**Figura 9.1**

Idiograma dos cromossomos X e Y sob resolução de 550 a 700 bandas cromossômicas por lote haploide, com algumas bandas cromossômicas especificadas. As barras à direita indicam as regiões pseudoautossômicas (PARs).

gonadoblastoma. Esse *locus* foi localizado em uma região próxima ao centrômero, podendo ser um único gene ou ainda múltiplos *loci* GBY dispersos no cromossomo Y.

As regiões distais dos braços curtos dos cromossomos X e Y contêm sequências de DNA altamente similares, as quais, por apresentarem alta homologia no homem e na mulher, foram denominadas regiões pseudoautossômicas (PARS). Há duas dessas regiões nos cromossomos X e Y: a região pseudoautossômica 1 (PAR1), que abrange 2,6 Mb e está localizada na região terminal dos braços curtos dos cromossomos X e Y, e a região pseudoautossômica 2 (PAR2), que abrange somente 320 kb e está localizada na região terminal de seus braços longos. Durante a meiose masculina normal, quando todos os cromossomos autossômicos se emparelham com seus pares, os cromossomos X e Y se emparelham por essas regiões, onde ocorre recombinação meiótica (*crossing-over*), principalmente na PAR1. A taxa de recombinação na região PAR1 é extremamente alta na meiose masculina, sendo a frequência mais alta observada no genoma.

Na região PAR1 há pelo menos 24 genes, metade deles com funções conhecidas. Entre eles, encontra-se o gene *SHOX* (*short stature homeobox*), cuja haploinsuficiência contribui para certas características da síndrome de Turner. Por outro lado, somente quatro genes foram identificados na região PAR2. A deleção da região PAR1 resulta em falha do emparelhamento dos cromossomos sexuais e esterilidade masculina, enquanto que a deleção da PAR2 não é necessária para a fertilidade. A maioria dos genes do cromossomo Y apresenta seus correspondentes no cromossomo X, sendo que esses genes não estão sujeitos à inativação, da mesma forma que ocorre na região pseudoautossômica.

## Alterações dos cromossomos sexuais

As alterações dos cromossomos sexuais, do mesmo modo que ocorre nas alterações dos cromossomos autossômicos, podem ser numéricas ou estruturais. Dessa forma, essas alterações podem ser causadas tanto pela fal-

ta quanto pela presença de cópias extras dos cromossomos sexuais, assim como por alterações estruturais destes cromossomos. Muito frequentemente, as alterações dos cromossomos sexuais aparecem na forma de mosaico ao lado de linhagens celulares normais ou de outras linhagens com anormalidades cromossômicas.

As alterações dos cromossomos sexuais podem afetar a determinação sexual, o desenvolvimento sexual ou a fertilidade, além de outras características fenotípicas. Com exceção da monossomia Y, as aneuploidias dos cromossomos sexuais são viáveis e compatíveis com um crescimento e desenvolvimento relativamente normais.

Apesar de os sinais e sintomas das alterações dos cromossomos sexuais variarem amplamente, as aneuploidias desses cromossomos acarretam alterações fenotípicas menos graves do que as associadas a defeitos de cromossomos autossômicos comparáveis. Um dos motivos para explicar essa observação está relacionado à inativação do X, uma vez que todos os cromossomos X, menos um, são inativados nas células somáticas.

Algumas características diferenciam as alterações dos cromossomos sexuais das dos cromossomos autossômicos:

- As aneuploidias dos cromossomos sexuais são mais frequentes do que as dos autossomos. Em recém-nascidos não selecionados, verifica-se cerca de 0,1% de casos de aneuploidias de autossomos e cerca de 0,2% de aneuploidias de cromossomos sexuais. Essa diferença pode ser explicada tanto por uma taxa mais alta de perdas fetais das aneuploidias de autossomos quanto por uma maior suscetibilidade dos cromossomos sexuais a sofrerem erros meióticos, principalmente na meiose masculina, quando os cromossomos X e Y se emparelham somente pelas regiões pseudoautossômicas, formando uma sinapse mais instável.
- Os cromossomos sexuais parecem ser mais propensos a erros durante a mitose do que os autossomos, como indicado por uma frequência mais alta de mosaicismo cromossômico. Cerca de 10 a 20% de todas as aneuploidias de cromossomos sexu-

- ais estão em mosaicos, sendo esses menos frequentes em alterações dos autossomos.
- As trissomias dos autossomos afetam muito mais o fenótipo do que as trissomias dos cromossomos sexuais. Enquanto a deficiência mental é um achado consistente nas aneuploidias dos autossomos, apesar de a inteligência média ser abaixo do normal nas aneuploidias dos cromossomos sexuais, o comprometimento do desenvolvimento mental não é tão pronunciado como nas aneuploidias dos autossomos.
  - Nas alterações dos cromossomos sexuais, as alterações fenotípicas afetam mais o desenvolvimento dos órgãos sexuais. Podem ocorrer outras malformações, principalmente na síndrome de Turner, mas em geral elas são menos frequentes e menos graves.
  - A expectativa de vida está muito diminuída nas aneuploidias dos autossomos, mas não nas dos cromossomos sexuais.

As tetrassomias e pentassomias dos autossomos não são viáveis, mas podem ser verificadas quanto aos cromossomos sexuais.

- As monossomias dos autossomos são letais, enquanto que a monossomia do cromossomo X é viável, apesar de resultar em uma alta taxa de perdas fetais.

As anormalidades dos cromossomos sexuais são relativamente comuns na população, com uma frequência geral de 1 a cada 500 nas-

cimentos. A incidência dos diferentes tipos de alterações em crianças nativas é apresentada na **Tabela 9.1**.

### Síndrome de Klinefelter

A síndrome de Klinefelter é uma das formas mais comuns de hipogonadismo hipergonadotrófico nos homens. Ela é decorrente da presença de um cromossomo X extra ou, mais raramente, de dois ou três cromossomos X extras.

### Histórico

A síndrome de Klinefelter foi descrita em 1942, por Klinefelter e colaboradores,<sup>1</sup> em pacientes que apresentavam ginecomastia, oligospermia, testículos pequenos com tecido testicular hialinizado, pênis normal e gonadotrofinas urinárias aumentadas. Em 1956, foi descrita a presença de corpúsculos de Barr em células de pacientes com a síndrome de Klinefelter, havendo a suspeita da presença de um cromossomo X extra, o que foi confirmado três anos depois, em 1959, por Jacobs e Strong.<sup>2</sup> Esses autores verificaram a presença de um cromossomo adicional submetacêntrico nas células de um paciente com as características típicas da síndrome de Klinefelter, o que fez com que os autores interpretassem como sendo um cariótipo 47,XXY. Outros casos confirmaram ser este o cariótipo mais frequentemente verificado em pacientes com a síndrome.

**TABELA 9.1**  
Incidência de anormalidades dos cromossomos sexuais

Sexo	Doença	Cariótipo	Incidência
Homens	Síndrome de Klinefelter	47,XXY 48,XXXY Outros	1:1.000 homens 1:25.000 homens 1:10.000 homens
	Síndrome do duplo Y	47,XYY	1:1.000 homens
	Outras alterações de X ou Y		1:1.500 homens
Mulheres	Síndrome de Turner	45,X 46,X,i(Xq) Outros	1:10.000 mulheres 1:50.000 mulheres 1:15.000 mulheres
	Trissomia X	47,XXX	1:1.000 mulheres
	Outras anormalidades do X		1:3.000 mulheres

## ***Incidência***

A incidência da síndrome de Klinefelter é de cerca de 1 em 1.000 nascimentos do sexo masculino e de 1 a cada 300 abortos espontâneos. Apesar de as características fenotípicas da síndrome serem relativamente leves, estima-se que cerca de 50% dos produtos de concepção 47,XXY sejam abortados.

## ***Clínica***

A síndrome de Klinefelter em geral não é reconhecida na infância, apesar de poder haver desvios de comportamento e dificuldades de aprendizagem. Os meninos entram na puberdade na idade normal, apesar de haver produção de níveis mais baixos de testosterona. Em geral, os sinais de hipogonadismo tornam-se evidentes com a puberdade. Os testículos, que em geral são pequenos durante a infância, se mantêm pequenos nos adultos, e as características sexuais secundárias permanecem pouco desenvolvidas. O diagnóstico mais frequente é realizado na vida adulta em decorrência da infertilidade, apesar de os sinais clínicos serem altamente variáveis. O único sinal obrigatório na síndrome é a presença de testículos pequenos, associados a azoospermia e, menos frequentemente, a oligospermia acentuada e níveis aumentados de FSH.

O exame histológico do tecido testicular mostra que os testículos pré-puberais demonstram túbulos seminíferos com espermatogônias, havendo posteriormente uma perda progressiva de epitélio germinativo e a formação de túbulos seminíferos hialinizados atrofiados com ausência de elementos germinativos.

Em menos da metade dos pacientes, na adolescência pode haver o aparecimento de ginecomastia, que leva a um risco aumentado de câncer de mama. Os pacientes com a síndrome de Klinefelter em geral são altos e magros, com membros relativamente longos. Criptorquidia é infrequente, exceto nos casos com cariótipo 48,XXXY. A distribuição de gordura em geral segue um padrão feminino. Os pelos corporais são escassos e a massa muscular tende a ser reduzida. A maioria dos pacientes apresenta ereções e ejaculações normais.

Os pacientes com mais de um cromossomo X adicional apresentam um fenótipo correspondentemente mais grave do que os com cariótipo 47,XXY.

## ***Fertilidade***

Os indivíduos afetados, com raras exceções, são inférteis. Verifica-se que cerca de 3% dos homens inférteis e que de 5 a 10% dos homens com oligospermia ou azoospermia apresentam a síndrome de Klinefelter. Nos casos de mosaicos 47,XXY/46,XY, as alterações testiculares são menos graves, havendo azoospermia em mais da metade dos casos, mas também podendo haver homens férteis. Em poucos casos com cariótipo 47,XXY são verificados espermatozoides adequados para a realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), mas com risco de formação de zigotos aneuploides.

## ***Inteligência***

A deficiência mental não é uma característica marcante da síndrome, apesar de haver casos com um leve comprometimento intelectual e diminuição da compreensão verbal. No caso de haver mais do que um cromossomo X extra, verifica-se maior comprometimento mental e maior dificuldade de aprendizagem, leitura, linguagem e adequação psicossocial. Características psicopatológicas podem ser notadas em alguns pacientes, havendo aumento de tendência a reações neuróticas e psicóticas.

## ***Tratamento***

A terapia de reposição da testosterona pode ser utilizada após a adolescência para corrigir a deficiência androgênica, produzindo um melhor desenvolvimento das características sexuais secundárias e redução de risco de osteoporose.

## ***Cariótipos***

A síndrome de Klinefelter é causada por uma ou mais cópias extras de um cromossomo X na presença do cromossomo Y. Cerca

de 80% dos pacientes apresentam cariótipo 47,XXY, sendo que um dos cromossomos X permanece inativo durante a interfase e aparece como corpúsculo de Barr. Nesses casos, dados citogenéticos e moleculares sobre a origem parental e o estágio meiótico do erro de não disjunção responsável pela síndrome indicam que o cromossomo X extra pode ser, com igual frequência, de origem paterna ou materna. Na meiose paterna, a não disjunção cromossômica ocorre na meiose I, possivelmente estando relacionada com a redução ou falha na recombinação meiótica, uma vez que os cromossomos X e Y se emparelham na meiose somente em suas regiões pseudoautossômicas de Xp e Yp. No caso de erros na meiose materna, na maioria das vezes ocorre a não disjunção na meiose I, que está relacionada à idade materna.

Em uma pequena porcentagem de casos, há variantes da síndrome de Klinefelter com cariótipos outros que não o 47,XXY, incluindo os cariótipos 48,XXXY, 48,XXYY, 49,XXXXY e 49,XXYY.

O cariótipo 48,XXYY ocorre em 1:50.000 nascimentos masculinos, sendo a variante mais frequente da síndrome de Klinefelter, podendo resultar em macrosomia, deficiência mental mais pronunciada e estatura mais elevada do que a de pacientes com cariótipo 47,XXY. Nesses casos, o erro meiótico mais provável é a não disjunção nas meioses I e II paterna, resultando em um espermatozoide XYY. O cariótipo 49,XXXXY é cerca de quatro vezes mais frequente do que a variante 48,XXXY e, nesses casos, as alterações aparecem no início da infância por falha de crescimento, resultando em uma síndrome distinta da síndrome de Klinefelter típica, com hipogonadismo, deficiência mental, hipertelorismo ocular, epicanto, pregas transversais voltadas para cima, palato alto, defeitos cardíacos e anormalidades esqueléticas, sendo a mais frequente a sinostose radioulnar. Nos casos de cariótipo 49,XXXXY, a origem dos cromossomos X extras é materna, sugerindo uma não disjunção desses cromossomos na meiose I e também na meiose II. Dentre os casos com a síndrome de Klinefelter, cerca de 10 a 15% dos casos apresentam mosaicismos, sendo o mais comum o cariótipo 47,XXY/46,XY.

Além desses cariótipos, existem pacientes que apresentam o fenótipo da síndrome de

Klinefelter excluindo a estatura elevada, mas que demonstram o cariótipo 46,XX. Nesses casos, os homens XX são, na maioria das vezes, decorrentes da presença do gene *SRY* translocado para um dos cromossomos X devido a um *crossing-over* anormal fora da região pseudoautossômica de Xp e Yp.

## Síndrome 47,XXY

O cariótipo 47,XXY resulta na síndrome conhecida como duplo Y, apesar de não haver um fenótipo característico.

## Histórico

O primeiro caso de dois cromossomos Y foi relatado em 1960, por Mundal e Ockey,<sup>3</sup> em um paciente com fenótipo da síndrome de Klinefelter e cariótipo 48,XXYY. O primeiro caso de 47,XXY foi descoberto ao acaso em um indivíduo com filho com a síndrome de Down. Vários outros casos foram descritos em condições diversas, todas sem relevância clínica. Em 1965, entretanto, Jacobs e colaboradores<sup>4</sup> observaram que o cariótipo 47,XXY era mais frequente em homens internados em instituições penais e em reformatórios, particularmente em homens com estatura elevada.

## Incidência

Indivíduos com cariótipo 47,XXY ocorrem em 1 a cada 1.000 nascimentos masculinos e em cerca de 4 a 200 por 1.000 indivíduos de instituições penais e mentais.

## Clínica

Não há um fenótipo típico da síndrome, sendo que a única característica associada ao cariótipo 47,XXY é a alta estatura, não sendo essa característica um achado consistente. A maioria dos casos passa despercebida na população. Pode haver anormalidades de comportamento com diminuição de tolerância à frustração e do autocontrole e também hiperatividade. Comportamento agressivo, no entanto, é pouco comum. Os pacientes podem apresentar hipogonadismo e tendência a desenvolver acne facial.

## Fertilidade

A maioria dos pacientes 47,XYY é fértil. Tem sido evidenciado que o cromossomo Y extra é eliminado na maioria das células que formarão os espermátocitos, de modo que ocorre um emparelhamento normal do bivalente X-Y na meiose. Assim, os homens 47,XYY não apresentam um risco aumentado de filhos com aneuploidias dos cromossomos sexuais.

## Inteligência

A inteligência é normal, apesar de haver um aumento na incidência de dificuldade de aprendizagem.

## Cariótipos

O cariótipo 47,XYY resulta de uma não disjunção na meiose II paterna. Pode haver casos em mosaico. Raramente, pode haver mais de uma cópia extra do cromossomo Y. Os casos de homens 48,XYYY apresentam diferentes graus de manifestações fenotípicas, não afetando necessariamente a inteligência e o comportamento. Mais raramente, verifica-se o cariótipo 49,XYYYY podendo resultar em deficiência mental, alterações faciais, como hipertelorismo ocular, orelhas de implantação baixa e micrognatia, e anormalidades esqueléticas, como sinostose radioulnar, escoliose e clinodactilia.

## Trissomia X

A síndrome do triplo X, também denominada síndrome 47,XXX ou trissomia X, resulta de uma cópia extra do cromossomo X. A trissomia X em mulheres não é um evento raro, e não resulta em uma síndrome reconhecível, podendo passar despercebida.

## Histórico

O primeiro caso descrito de cariótipo 47,XXX foi relatado por Jacobs e colaboradores<sup>5</sup> em uma mulher com amenorreia secundária.

## Incidência

O cariótipo 47,XXX ocorre em 1 a cada 1.000 mulheres.

## Clínica

As mulheres com essa síndrome, apesar de apresentarem estatura acima da média, em geral não são fenotipicamente anormais. Algumas delas são identificadas em clínicas de infertilidade ou em instituições para deficientes mentais, mas certamente muitas permanecem não sendo reconhecidas na população.

## Fertilidade

As mulheres 47,XXX podem apresentar ovários normais, cujo desenvolvimento depende da presença de pelo menos dois cromossomos X normais, na ausência do cromossomo Y. O acompanhamento de pacientes 47,XXX indica que as mudanças puberais ocorrem na idade apropriada e que a maioria apresenta história menstrual normal. Cerca de 20% das mulheres 47,XXX apresentam disfunção ovariana, atraso da menarca, oligomenorreia, amenorreia secundária e desenvolvimento pobre das características sexuais secundárias.

As mulheres 47,XXX em geral são férteis, produzindo na grande maioria das vezes crianças cromossomicamente normais. Uma explicação para esse fato seria a de o cromossomo X extra ser segregado preferencialmente para o primeiro corpúsculo polar na meiose I.

## Inteligência

Em geral, as mulheres 47,XXX apresentam inteligência normal ou, algumas vezes, ligeiramente reduzida. Cerca de 70% dos casos relatados apresentam dificuldades leves de aprendizagem. Há uma tendência a apresentarem problemas psicológicos, incluindo depressão e psicose.

## Cariótipos

As células 47,XXX apresentam dois cromossomos X inativos na intérfase, demons-



trando dois corpúsculos de Barr. Em cerca de 95% dos casos, o cromossomo X extra resulta da não disjunção na meiose I materna, havendo associação com a idade materna avançada.

## Mulheres com outras polissomias do cromossomo X

Mulheres com polissomias X maiores do que a trissomia são raras. Enquanto a trissomia X não gera alterações fenotípicas marcantes, os cariótipos 48,XXXX e 49,XXXXX resultam em deficiência mental e outras alterações fenotípicas. Pode ocorrer desenvolvimento incompleto das características sexuais secundárias, e algumas pacientes podem apresentar disgenesia gonadal. Problemas comportamentais e verbais são comuns. Alterações menstruais ocorrem com maior frequência do que nas mulheres com trissomia X, e a fertilidade é reduzida. A tetrassomia X (48,XXXX) está associada a uma deficiência do desenvolvimento mental e físico não tão grave quanto na pentassomia X (49,XXXXX), a qual em geral leva a um maior comprometimento do desenvolvimento, havendo vários efeitos físicos, como hipertelorismo ocular, epicanto e estrabismo. Nas tetrassomias e pentassomias X, os cromossomos X extras são de origem materna, decorrentes de não disjunção nas meioses I e II.

## Síndrome de Turner

A síndrome de Turner é um tipo especial de hipogonadismo hipergonadotrófico caracterizado por um fenótipo feminino, disgenesia gonadal e imaturidade sexual.

## Histórico

A síndrome de Turner foi descrita por Ullrich<sup>6</sup> e por Turner,<sup>7</sup> a partir do estudo de várias mulheres com linfedema dos pés na infância, baixa estatura, amenorreia e ausência de características sexuais secundárias, entre outros achados. Em 1941, Sharpey-Shafer<sup>8</sup> descreveu outros casos semelhantes, tendo identificado gônadas em fita e denominado a síndrome como síndrome de Turner. Com base nos experimentos de Jost,<sup>9</sup> demonstrando que coelhos dos quais eram retiradas as

gônadas durante a vida embrionária precoce desenvolviam diferenciação de tubas uterinas, útero, vagina e genitália externa feminina independente do sexo cromossômico do animal, Wilkins<sup>10</sup> previu que a síndrome de Turner poderia ser decorrente da ausência de função gonadal no início da vida fetal. Wilkins e colaboradores<sup>11</sup> e Polani e colaboradores<sup>12</sup> verificaram ausência de cromatina X em mulheres com a síndrome de Turner, sendo que, no ano de 1959, Ford e colaboradores<sup>13</sup> relataram a presença de um único cromossomo X em células da medula óssea de uma mulher com as características da síndrome de Turner que apresentava cromatina X negativa. Desde então, vários outros tipos de cariótipo foram descritos na síndrome, como os com mosaicismo cromossômico ou com alterações estruturais do segundo cromossomo X.

## Incidência

A incidência do fenótipo da síndrome de Turner é de cerca de 1 em 5.000 nascimentos femininos, sendo muito menos comum do que outras aneuploidias dos cromossomos sexuais. Entretanto, na concepção, a monossomia X é muito mais frequente, ocorrendo em cerca de 1 a 2% de todas as gestações reconhecidas clinicamente. A sobrevivência a termo da monossomia X é um evento raro, uma vez que mais de 99% dos fetos são abortados espontaneamente, em geral em torno da 28ª semana de gestação. Os fetos 45,X são mais frequentemente abortados do que os fetos com mosaicismo cromossômico. Ainda não está claro por que na grande maioria das vezes o cariótipo 45,X é letal *in utero*, uma vez que é compatível com a sobrevivência pós-natal, resultando em nativos com poucas intercorrências clínicas. Uma das hipóteses da sobrevivência de fetos com monossomia X é a de que as pacientes 45,X que sobrevivem seriam de fato mosaicos com linhagens normais 46,XX não detectadas ou confinadas à placenta, as quais assegurariam a viabilidade do feto.

## Clínica

A síndrome de Turner é a única aneuploidia de cromossomos sexuais que resulta em uma síndrome específica, de forma que pode

ser reconhecida no nascimento ou mesmo antes da puberdade. A maioria dos produtos da concepção de pacientes com síndrome de Turner apresenta um intenso edema intrauterino (hidropsia fetal), sendo o edema nucal um achado comum em ultrassonografia fetal. O retardo de crescimento inicia-se já no período intrauterino, mas se torna mais evidente no início da infância. O peso ao nascimento é baixo, mas a diferença pode não ser marcante por causa do linfedema dos pés e das mãos, presente em mais da metade dos recém-nascidos 45,X. O linfedema pode persistir por vários meses, desaparecendo em geral por volta dos dois anos de idade.

A baixa estatura proporcionada é um achado marcante na síndrome de Turner, acometendo entre 95 e 100% das pacientes. Em 20 a 30% dos casos, pode haver suspeita clínica da síndrome após o nascimento em virtude da presença de “estigmas turnerianos”. Em cerca de 30% dos casos, as crianças podem ser diagnosticadas em idade escolar em decorrência da baixa estatura e da velocidade de crescimento reduzida. O crescimento pré-puberal é retardado, não havendo o estirão da puberdade, o que pode levar à suspeita de síndrome. A estatura média das mulheres adultas é de três desvios-padrão abaixo da média, em geral atingindo 1,4 a 1,45 m. A síndrome de Turner é responsável por uma proporção significativa, estimada em 6%, de todas as mulheres com baixa estatura.

Nas mulheres adultas, não há desenvolvimento das características sexuais secundárias, havendo falta de crescimento das mamas e escassez de pelos pubianos e axilares. Verificam-se níveis aumentados de gonadotrofinas hipofisárias. Durante a idade adulta, a amenorreia (primária ou secundária) e a infertilidade são as principais queixas que conduzem ao diagnóstico da síndrome. As gônadas se apresentam “em fita”, ricas em tecido conjuntivo fibroso e desprovidas de oócitos e de folículos ovarianos. Verifica-se que a presença de dois cromossomos X íntegros na ausência de cromossomo Y é uma condição essencial para o desenvolvimento ovariano normal.

A aparência facial das pacientes pode ser grosseira, havendo ptose palpebral, olhos com fendas palpebrais oblíquas inclinadas para baixo, pregas epicânticas, hipertelorismo ocular, sobrancelhas espessas e orelhas de

implantação baixa, giradas posteriormente e/ou dismórficas. Em geral, ocorrem alterações dentárias, implantação baixa de cabelos na nuca, micrognatia, pescoço curto e/ou alado. Na síndrome de Turner também verificam-se tórax em barril, esterno curto e aumento da distância intermamilar. Nas extremidades, pode haver cúbito valgo, mãos pequenas, encurtamento do quarto e do quinto metacarpos e metatarsos e displasias ungueais. Verificam-se, ainda, nevos pigmentados.

Malformações renais são observadas em cerca de 30% dos casos, incluindo rins em feradura e má rotação dos rins. As cardiopatias congênitas estão presentes em 23 a 40% das pacientes, sendo as mais comuns a coarctação da aorta e a valva aórtica bicúspide. As mulheres adultas com síndrome de Turner apresentam um risco aumentado de doenças cardiovasculares, representadas por hipertensão arterial sistêmica e doença isquêmica cardíaca. A prevalência de doença autoimune da tireoide e de osteoporose é maior na síndrome de Turner quando comparada com a da população em geral. Quanto à morbidade em adultos com a síndrome, as mulheres apresentam um risco aumentado de fraturas por osteoporose, diabetes, hipertensão e infarto, com diminuição da expectativa média de vida.

As mulheres com cariótipo 45,X são clinicamente indistinguíveis daquelas com isocromossomo do braço longo do X. Nos casos em mosaico, o fenótipo clínico depende da proporção e distribuição das populações celulares nos diferentes tecidos. O atraso de crescimento é menos pronunciado, e o quadro clínico pode variar dependendo do tipo de cariótipo. Casos com cromossomos X estruturalmente anormais em geral apresentam a síndrome incompleta, com exceção dos casos de isocromossomo do braço longo do X. Os casos com deleção do braço longo e com isocromossomo do braço curto apresentam gônada em fita e infantilismo sexual, mas não baixa estatura. A haploinsuficiência de genes do braço curto provavelmente esteja relacionada às características somáticas da síndrome de Turner.

## Fertilidade

A infertilidade é uma das principais características da síndrome, apesar de haver

raros casos com mosaïcismo 45,X/46,XX que apresentam menstruação normal e até fertilidade. Os poucos casos de gravidez em mulheres 45,X provavelmente são decorrentes de mosaïcismo gonadal, havendo uma linhagem 46,XX nos ovários. Essas mulheres apresentam um risco elevado de prole com aneuploidias cromossômicas.

Em alguns casos de variantes da síndrome de Turner com monossomia parcial do cromossomo X, como as deleção parciais de Xp de Xq e grandes anéis do cromossomo X, a fertilidade pode ser mantida, com risco para a prole de apresentar a mesma alteração cromossômica.

As mulheres com síndrome de Turner e falha ovariana podem ser submetidas à fertilização *in vitro* com óvulos doados e transferência de embrião, apesar de haver um risco aumentado de aborto, principalmente devido a fatores uterinos.

## Inteligência

A deficiência mental não é uma característica da síndrome, mas pode haver um leve comprometimento das atividades intelectuais e verbais, além de diminuição da capacidade de percepção espacial.

As mulheres com síndrome de Turner apresentam um maior risco de comprometimento do ajuste social. Verifica-se que em geral as mulheres 45,X com o único X de origem paterna têm uma melhor adaptação social, com funções verbais e executivas superiores, do que as com o único X de origem materna.

## Tratamento

O fenótipo externo das pacientes não tratadas é semelhante ao de meninas pré-púberes. As características sexuais secundárias não se desenvolvem sem que haja reposição hormonal. Os órgãos genitais continuam imaturos, com tubas uterinas pequenas e útero infantil.

A deficiência estrogênica crônica atinge de 95 a 98% das pacientes e ocorre devido à disgenesia gonadal. Assim, na maioria das pacientes, a terapia de reposição de estrogênio deve ser introduzida na idade puberal para promover o desenvolvimento das característi-

cas sexuais secundárias e prevenir a osteoporose, bem como para as mulheres serem compensadas psicologicamente com o fenômeno da menstruação.

O tratamento com hormônio do crescimento (GH recombinante) pode levar a um ganho médio de 6 cm na estatura final das mulheres adultas.

## Cariótipos

A constituição cromossômica da síndrome de Turner envolve perda ou alteração do segundo cromossomo X em pelo menos algumas células do indivíduo. A alteração mais frequente na síndrome de Turner, encontrada em pouco mais de 50% dos casos, é a monossomia do cromossomo X, havendo cariótipo 45,X e cromatina X negativa. A única monossomia completa de um cromossomo inteiro que é compatível com a vida é a monossomia do cromossomo X. Dois mecanismos patogênicos podem levar ao cariótipo 45,X: a não disjunção cromossômica e a perda cromossômica na anáfase. Tanto em nativos como em abortos 45,X, em cerca de 80% dos casos o único cromossomo X é de origem materna, tendo assim ocorrido erro na meiose paterna.

Cerca de 20% das mulheres com a síndrome de Turner apresentam cromossomos X estruturalmente anormais, incluindo o isocromossomo do braço longo do cromossomo X, com cariótipo 46,X,i(X)(q10). Apesar de esse cromossomo ser comumente descrito como sendo decorrente de erro na divisão do centrômero, a grande maioria dos isocromossomos do braço longo do cromossomo X é dicêntrica e contém quantidades variáveis de material de Xp. Assim, esses cromossomos são originados mais provavelmente por trocas tipo U envolvendo as cromátides-irmãs do braço curto de um cromossomo X. Os isocromossomos dicêntricos, apesar de apresentarem um dos centrômeros inativado, parecem resultar em instabilidade celular e não disjunção cromossômica, uma vez que os cariótipos com i(Xq) frequentemente aparecem na forma de mosaico com linhagens 45,X. Existe uma correlação direta entre a quantidade de Xp presente entre os centrômeros dos isocromossomos de X dicêntricos e a porcentagem das linhagens 45,X.

Outras alterações estruturais do X podem estar presentes na síndrome de Turner, como deleções do braço longo ou curto do X, pequenos fragmentos cêntricos e cromossomos em anel derivados tanto do cromossomo X quanto do Y. Em mais de 25% dos casos, a monossomia X pode aparecer em mosaico com linhagens 46,XX, 47,XXX ou com cromossomos X estruturalmente anormais. A presença de mosaicismo com células aneuploides indica que erros nas divisões dos cromossomos devem ter ocorrido em mitoses após a formação do zigoto. Por outro lado, os casos de mosaicismo contendo cromossomos X estruturalmente anormais em geral são decorrentes de erros meióticos seguidos por erros mitóticos dependentes da instabilidade do cromossomo X alterado. Assim, estima-se que na síndrome de Turner o erro pode ter sido meiótico (em cerca de 80% dos casos na meiose paterna), mitótico, ou em ambas as divisões.

### 45,X/46,XY e variantes

Alguns pacientes com monossomia X podem apresentar, além da linhagem 45,X, uma linhagem 46,XY. Os cariótipos 45,X/46,XY ou, mais raramente, 45,X/47,XY, ou aqueles com uma linhagem celular 45,X e outra com um cromossomo Y estruturalmente alterado, resultam em disgenesia gonadal mista. Os pacientes apresentam uma gônada vestigial (em fita) de um lado e testículo disgenético com canais seminíferos hipoplásicos do outro. A maioria dos pacientes é criada como mulheres, apesar de poder haver certo grau de masculinização com clitóris aumentado e proporções corporais masculinas. Pode haver um fenótipo masculino com hipogonadismo, hipospadia, micropênis, escroto anormal e infertilidade. Em vários casos, há hérnia inguinal. Útero e tubas uterinas estão sempre presentes, além de remanescentes dos ductos mesonéfricos, como vasos deferentes rudimentares, especialmente do lado da gônada masculina. Os pacientes em geral são estéreis. Cerca de um terço dos pacientes apresenta algumas características da síndrome de Turner, como pescoço alado, baixa linha de implantação do cabelo na nuca, tórax em barril, nevos pigmentados e cúbito valgo. A baixa estatura ocorre em alguns casos. Há um risco aumentado (cerca de 20%) de desenvolvimento de gonadoblastoma

no testículo intra-abdominal. Gonadectomia do testículo é recomendada, inclusive porque o testículo intra-abdominal geralmente não é funcional. Além disso, nos pacientes criados como mulheres, há o risco de, ao atingirem a puberdade, sofrerem virilização com aumento do clitóris, hirsutismo e mudança de voz. O cariótipo 45,X/46,XY em geral surge a partir de um zigoto masculino normal com perda subsequente do cromossomo Y. Pode haver, ainda, o cariótipo 45,X/47,XY originado por não disjunção cromossômica.

### Cariótipo 46,XX/46,XY

O cariótipo 46,XX/46,XY em geral é identificado na investigação de genitália ambígua, incluindo casos de hermafroditismo verdadeiro, nos quais há a presença de tecido testicular e ovariano no mesmo indivíduo, seja como estruturas separadas, seja como um ovotestis. Esse cariótipo é responsável por cerca de 20% dos casos de hermafroditismo verdadeiro, sendo que os demais apresentam cariótipos normais, a maioria 46,XX. Um dos mecanismos de formação desse cariótipo seria o da fusão de dois zigotos resultando em quimeras.

### Alterações estruturais do cromossomo X

Além do isocromossomo de Xq, frequentemente envolvido na síndrome de Turner, o cromossomo X pode apresentar outras alterações estruturais, como translocação, deleções e duplicações.

Uma vez que os homens apresentam apenas um cromossomo X, as alterações estruturais do X nos homens resultam em consequências fenotípicas mais graves do que nas mulheres, as quais apresentam dois cromossomos X e que se beneficiam, ainda, da inativação preferencial do X anormal nos casos de deleção, duplicação e translocação não equilibrada.

Assim, enquanto uma duplicação parcial do X pode não acarretar alteração fenotípica nas mulheres portadoras, a mesma duplicação nos homens pode causar vários efeitos fenotípicos como hipotonia, atraso do desenvolvimento e microcefalia, em virtude da disomia funcional dos genes em duplicado no

X. Por outro lado, nos homens, as deleções do cromossomo X produzem nulissomia para o segmento deletado, resultando em letalidade do embrião ou em síndromes de genes contíguos, caso a deleção seja muito pequena (submicroscópica).

### *Deleção de Xp*

As mulheres com deleção da região distal de Xp em geral apresentam estigmas de Turner suaves e baixa estatura. Podem apresentar ou não amenorreia primária ou irregularidade dos ciclos menstruais. Os homens com deleção de Xp demonstram síndromes de genes contíguos, caracterizadas por diferentes combinações de fenótipos, dependendo da localização e da extensão do segmento deletado. Entre as doenças que podem aparecer, encontram-se a ictiose ligada ao X e a síndrome de Kallmann. No caso das mulheres com deleção de Xp, como normalmente há inativação preferencial do X anormal, elas em geral não apresentam manifestações clínicas, apesar de poder haver baixa estatura e algumas características da síndrome de Turner. Em geral as mulheres com deleções terminais com ponto de quebra em Xp11 apresentam falha ovariana completa, enquanto que aquelas com deleções terminais a partir de Xp21 mostram somente falha ovariana prematura.

### *Deleção de Xq*

As deleções parciais de Xq em geral resultam em disgenesia gonadal e fenótipos variáveis. Em menos da metade dos casos verifica-se baixa estatura. As mulheres com deleção de Xq a partir de Xq13 têm maior chance de ter falha ovariana completa, enquanto que aquelas com deleções mais distais a partir de Xq24 podem apresentar um fenótipo feminino normal com somente falha ovariana prematura. As características da síndrome de Turner são menos comuns em deleções de Xq do que de Xp. Deleções de grandes segmentos de Xq em homens não são compatíveis com a vida. As deleções em um dos cromossomos X das mulheres em geral não envolvem a região Xq13, onde se localiza o centro de inativação do X. O gene XIST (*X inactivation-specific transcript*) está localizado nessa região, sem a

qual não há a inativação do X anormal, o que resulta em um grave desequilíbrio genético, na maioria das vezes inviável.

### *Duplicação de Xp*

Mulheres com duplicações de Xp podem apresentar fenótipo normal e ser férteis, uma vez que o cromossomo X alterado se inativa preferencialmente. Dependendo do segmento que está duplicado, as mulheres podem apresentar amenorreia. A duplicação do segmento Xp21.2 em cariótipo contendo um cromossomo Y resulta em fenótipo feminino, uma vez que a duplicação do gene *NROB1 (DAX1)* tem atividade antagonista ao gene *SRY*, impedindo a formação testicular.

### *Duplicação de Xq*

Da mesma forma que ocorre na duplicação de Xp, a maioria das mulheres com duplicação de Xq apresenta fenótipo normal em virtude da inativação preferencial do X anormal. Muitas vezes, essas mulheres são identificadas após o nascimento de um filho com alterações fenotípicas. Os homens com duplicação de Xq em geral apresentam deficiência mental e outras anomalias fenotípicas, pois há dissomia funcional dos genes da região em duplicado.

### *Inversão do cromossomo X*

Há casos de mulheres com disfunção ovariana com inversão do cromossomo X, principalmente quando a região crítica Xq13-26 está envolvida na aberração. Podem haver casos de inversão em homens ou mulheres com deficiência mental. A prole de indivíduos com inversão pericêntrica de X apresenta um risco elevado para alteração não equilibrada. A fertilidade no homem é variável.

### *Translocações X;autossomo*

As translocações recíprocas envolvendo o cromossomo X e um autossomo pertencem a uma categoria especial de translocação, uma vez que a inativação do X em geral segue um padrão de inativação não casual, de forma a haver o menor desequilíbrio funcional. Em ca-

so de translocações X;autossomo equilibradas, o cromossomo X normal se inativa preferencialmente, evitando que a inativação se propague para um segmento autossômico ou que haja dissomia funcional de genes do X que deveriam se inativar. Por outro lado, nos casos de translocações não equilibradas, da mesma forma que ocorre em deleções, duplicações e isocromossomos do X, verifica-se inativação predominante do cromossomo X alterado.

Enquanto a translocação X;autossomo equilibrada em geral resulta em um fenótipo normal nas mulheres, nos casos de translocações não equilibradas pode haver dissomia funcional de genes do cromossomo X, resultando em retardo mental e outros achados fenotípicos.

A maioria das mulheres portadoras de translocações X;autossomo equilibradas com pontos de quebra acima do centro de inativação em Xq13 não apresenta efeito fenotípico, enquanto pontos de quebra entre Xq13-q26 resultam quase que invariavelmente em disgenesia gonadal. Raramente as translocações X;autossomo estão associadas a doenças monogênicas, como na distrofia muscular de Duchenne, em decorrência de quebra cromossômica em Xp21 e ruptura do gene da distrofina, responsável pela doença. As mulheres férteis com translocação X;autossomo apresentam um risco elevado de prole com desequilíbrio cromossômico. Nas translocações não equilibradas podem haver deficiência mental e anomalias congênitas múltiplas.

Os homens com translocação X;autossomo em geral possuem fenótipo normal, mas frequentemente apresentam azoospermia e infertilidade, independente do ponto de quebra no X. Uma vez que as translocações Y;autossomo também resultam em infertilidade, acredita-se que o fator responsável pela falha na espermatogênese seja o pareamento inadequado do X e do Y.

## Genes do cromossomo X relevantes para o fenótipo

Enquanto as mulheres com isocromossomo do braço longo do cromossomo X apresentam características fenotípicas semelhantes àquelas com cariótipo 45,X, as mulheres com deleções parciais de Xp e Xq podem apresentar

fenótipos variáveis, incluindo características da síndrome de Turner.

Os estudos de pacientes com síndrome de Turner e cromossomos X estruturalmente anormais indicam que a monossomia para o braço curto do X é responsável pela baixa estatura e pela maioria das anormalidades somáticas da síndrome, enquanto que genes localizados no braço longo do X seriam responsáveis pelo desenvolvimento e pela manutenção ovariana.

Deleções de regiões de Xp mais proximais (Xp11.2-p22.1) parecem ser críticas para falha ovariana, baixa estatura, palato alto e possivelmente doença autoimune da tireoide, mas não para linfedema ou coarctação da aorta. A haploinsuficiência da região pericentromérica tem sido implicada no pescoço alado.

Deleções de genes do Xq parecem estar relacionadas à disgenesia gonadal, uma vez que mulheres com translocações X;autossomo com pontos de quebra no braço curto ou na região proximal do braço longo em geral apresentam função ovariana normal, enquanto aquelas com ponto de quebra em Xq13-q26 (conhecida como “região crítica” para a função ovariana) quase sempre apresentam disgenesia gonadal.

Uma vez que nas mulheres 46,XX um dos cromossomos X permanece inativo nas células somáticas, e que tanto as mulheres 45,X quanto as 46,XX apresentam um único X ativo, acredita-se que os genes sujeitos à inativação não devem ser os responsáveis pelas manifestações das características da síndrome de Turner. No entanto, esses genes podem ter um papel na disgenesia gonadal do ovário, pois ambos os cromossomos X estão ativos nos oócitos.

Assim, tem sido sugerido que genes presentes no X inativo que escapem à inativação e também genes presentes no Y (uma vez que indivíduos 46,XY não apresentam a síndrome de Turner) parecem ser os melhores candidatos para o fenótipo da síndrome. Apesar de a estatura ser uma característica multifatorial, o gene *SHOX*, mapeado na região PAR1 de Xp e Yp, é o principal candidato para a contribuição para a baixa estatura e as anormalidades ósseas observadas na síndrome de Turner.

Interessante é o fato de o desenvolvimento das gônadas ser normal nos primeiros meses

de desenvolvimento intrauterino nos casos de monossomia X. Após a formação dos folículos primordiais, a partir do quarto mês de gestação, inicia-se uma fase de degeneração dos oócitos fetais, os quais desaparecem em uma taxa bem acelerada, de forma que, em geral, estão completamente ausentes até a idade de dois anos, sendo o tecido substituído por um estroma fibroso.

Pode haver pacientes com a síndrome de Turner e com cromossomos X em anel pequenos ou com cromossomos pequenos derivados do X em substituição a um X normal. Nesses casos, frequentemente se verifica um fenótipo da síndrome de Turner mais grave com deficiência mental e malformações congênitas, uma vez que esses cromossomos X alterados pequenos são desprovidos do centro de inativação do X, localizado em Xq13. O fenótipo mais grave nessas pacientes pode ser atribuído à dissomia funcional de genes do X, os quais normalmente estariam com somente uma cópia ativa nas mulheres normais, mas que não se inativariam no X anormal. Pode haver ainda mulheres com síndrome de Turner com cromossomos em anel ou marcadores derivados do Y, as quais apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastoma.

## Alterações do Y

As alterações estruturais do cromossomo Y podem envolver seu braço curto, incluindo ou não o gene *SRY* ou, ainda, seu braço longo.

### Deleção de Yp

Deleções de Yp com perda do gene *SRY* resultam em um fenótipo feminino com gônadas em fita, podendo apresentar algumas características da síndrome de Turner, especialmente linfedema, mas não baixa estatura. Os homens com deleção de Yp são azoospermicos e podem ou não apresentar estigmas da síndrome de Turner.

### Deleção de Yq

Deleções do braço longo do Y envolvendo a porção heterocromática de Yq são compatíveis

com o desenvolvimento sexual e gonadal normal, sendo consideradas mais como variantes cromossômicas do que aberrações. Os pacientes com cariótipo 46,XYq-, identificados em decorrência de anormalidades da genitália ou de infertilidade, podem apresentar cromossomos Y com deleções maiores, envolvendo a porção eucromática de Yp, ou ainda apresentar esse cromossomo Y anormal sendo derivado de um X e/ou Y ou apresentando pequenos segmentos de autossomos translocados para ele. Esse cariótipo pode resultar em fenótipos variáveis desde homens normais com oligospermia, azoospermia, hipospádia e genitália ambígua, entre outras alterações.

Verifica-se que deleções de partes do braço longo do Y são responsáveis por falha na espermatogênese em cerca de 25% dos homens inférteis, sendo que a maioria das microdeleções é detectada somente por técnicas moleculares. Três regiões localizadas em Yq11, denominadas AZFa, AZFb e AZFc, frequentemente estão envolvidas em microdeleções de Yq e, por conterem uma alta densidade de genes responsáveis pelo comprometimento da espermatogênese, resultam em azoospermia.

## Anel do cromossomo Y

Em geral, nos anéis do cromossomo Y a região heterocromática distal de Yq está deletada. Esses cromossomos frequentemente estão em constituições cromossômicas com linhagens 45,X. Nos casos com mosaicismos, o fenótipo varia desde síndrome de Turner com gônadas em fita até ambiguidade genital, genitália externa masculina com azoospermia ou hipogonadismo. Os poucos casos de anel de Y não mosaico apresentam fenótipo masculino e podem apresentar azoospermia, criptorquidia, pênis pequeno, hipospádia e baixa estatura.

## Isocromossomo do Y

O isocromossomo é a aberração estrutural mais frequente do cromossomo Y. A maioria dos isocromossomos de Yp ou Yq é dicêntrica e está em mosaico, em geral com linhagens 45,X. Assim, o fenótipo resultante depende dos pontos de quebra e da porcentagem de linhagens 45,X. O espectro clínico pode variar

desde fenótipo masculino normal, com ou sem infertilidade, a fenótipo feminino com ou sem estigmas de Turner. Pode estar associado com genitália feminina, ambígua ou masculina. Nos indivíduos com fenótipo masculino frequentemente há hipospádia e azoospermia. Pode haver fenótipo feminino com características da síndrome de Turner. Os isocromossomos de Yp em geral resultam em genitália ambígua e características da síndrome de Turner com estatura normal, mas podem estar presentes em indivíduos fenotipicamente masculinos. Nos isocromossomos de Yq, o fenótipo é variável, sendo que a maioria apresenta fenótipo feminino com disgenesia gonadal, uma vez que há a perda do gene *SRY*. Alguns pacientes podem apresentar características da síndrome de Turner, baixa estatura e diferentes graus de ambiguidade genital, dependendo da linhagem 45,X.

## Translocações com o cromossomo Y

O cromossomo Y pode estar envolvido em translocação tanto com o cromossomo X quanto com autossomos.

A maioria das translocações do Y com o cromossomo X apresenta o segmento Yq11-qter translocado para Xp22 e resulta em baixa estatura. Esse derivado do cromossomo X na presença de um cromossomo X normal resulta em mulheres fenotipicamente normais, enquanto que na presença de um cromossomo Y podem haver alterações decorrentes da nulissomia de genes de Xp distal. Podem haver, ainda, translocações de diferentes segmentos do Y, contendo ou não os centrômeros tanto para o braço curto como para o braço longo do X, resultando algumas vezes em cromosso-

mos dicêntricos derivados do X. Os casos de translocações da região distal de Yp contendo o gene *SRY* para um cromossomo X podem resultar em indivíduos com cariótipo aparentemente 46,XX com sexo fenotípico masculino, hipogonadismo e azoospermia. Em geral, nesses casos a translocação é submicroscópica, sendo identificada somente por técnicas moleculares. Há poucos casos de derivados do cromossomo Y de translocações X;Y, todos com translocação da porção Xp22 ou Xq28 para Yq11 e resultando em homens com estatura normal, hipogonadismo, deficiência mental e várias características dismórficas.

O fenótipo dos casos de derivados do X da translocação X;autossomo depende basicamente de qual é o segundo cromossomo sexual (X ou Y) e do segmento de Y translocado para o X. A maioria das translocações entre cromossomo Y e autossomos envolve a região heterocromática do braço longo do Y para os braços curtos dos autossomos acrocêntricos. Essas translocações em geral são familiares e não levam a efeito fenotípico nem alteração da fertilidade. Outros autossomos também podem estar envolvidos em translocações recíprocas, a maioria associada a um fenótipo masculino com azoospermia, oligospermia ou infertilidade, e eventualmente com deficiência mental e/ou anormalidades congênitas. Os indivíduos com fenótipo feminino apresentam disgenesia gonadal com gônada em fita. Pode haver homens 45,X com translocação de pequenos segmentos de Yp para um autossomo, o que pode resultar em infertilidade. As translocações Y;autossomo podem resultar em um desequilíbrio de um segmento de autossomo, além do desequilíbrio de segmentos do Y, podendo levar a anormalidades extragenitais. Os homens com translocação Y;autossomo equilibrada em geral são inférteis.

## Referências

1. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, spermatogenesis without a-leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1942; 2:615-27.
2. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 1959 Jan 31;183(4657):302-3.
3. Muldal S, Ockey CH. The "double male": a new chromosome constitution in Klinefelter's syndrome. *Lancet.* 1960 Aug 27; 276(7148):492.
4. Jacobs PA, Brunton M, Melville MM, Brittain RP, McClellmont WF. Aggressive behavior, mental sub-normality and the XYY male. *Nature.* 1965 Dec 25;208(5017):1351-2.
5. Jacobs PA, Baikie AG, Brown WM, Macgregor TN, Maclean N, Harnden DG. Evidence for the



- existence of the human "super female". *Lancet*. 1959 Sep 26;2(7100):423-5.
6. Ullrich O. Über typische Kombinationsbilder multipler Abartungen. *Z Kinderheilkd*. 1930; 49:271-6.
  7. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*. 1938; 23(5):566-74.
  8. Sharpey-Shafer EP. Case of pterygo-nuchal infantilism. *Lancet*. 1941 Nov 08; 238(6167):559-60.
  9. Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp*. 1947; 36:271-315.
  10. Wilkins L. The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1950.
  11. Wilkins L, Grumbach MM, Van Wyk JJ. Chromosomal sex in ovarian agenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1954 Oct;14(10):1270-1.
  12. Polani PE, Hunter WF, Lennox B. Chromosomal sex in Turner's syndrome with coarctation of the aorta. *Lancet*. 1954 Jul 17;267(6829):120-1.
  13. Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*. 1959 Apr 4;1(7075):711-3.

---

## Leitura recomendada

Nussbaum RL, McInnes, RR, Willard HF. Thompson & Thompson: genética médica. 5ª ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2008.

Louise Lapagesse de Camargo Pinto  
Sharbel Weidner Maluf

# Mecanismo de inativação do cromossomo X e alterações cromossômicas

## Introdução

A inativação do cromossomo X é o processo que permite a equalização da dosagem gênica entre os sexos através da expressão de somente um dos cromossomos X, para a maioria dos genes. Os homens possuem apenas um cromossomo X (46,XY) e, dessa maneira, são considerados hemizigotos para os genes localizados nesse cromossomo. Por outro lado, as mulheres (46,XX) podem ser heterozigotas para os genes presentes no cromossomo X.

Este processo de inativação do cromossomo X ocorre em etapas precoces do desenvolvimento embrionário de várias espécies. Em camundongos, a inativação do cromossomo X ocorre no final do estágio de blastocisto (cerca de quatro a cinco dias após a fertilização).<sup>1</sup> Em humanos, a inativação pode ser observada durante a gastrulação (ao redor da segunda semana após a fertilização), quando o embrião é composto de uma massa de células que dará origem aos três folhetos embrionários.<sup>2-4</sup>

O cromossomo X inativo nos mamíferos, devido à conformação que adquire nas células somáticas durante a intérfase, é chamado de corpúsculo de Barr ou cromatina sexual. Lyon<sup>5</sup> propôs a hipótese da inativação do cromossomo X para explicar resultados inesperados de mutações que afetavam a coloração da pelagem de fêmeas de camundongos. A partir da observação de que algumas fêmeas apresentavam, na pelagem, um padrão de cores em mosaico, foi sugerido que:

- enquanto um dos cromossomos X expressava seus genes, em cada célula, o outro teria sido precocemente inativado durante a embriogênese;
- a escolha de qual cromossomo X, paterno ou materno, seria inativado era realizada aleatoriamente;
- uma vez tendo ocorrido a inativação, todas as células-filhas receberiam o mesmo cromossomo X inativado.

Resumindo os postulados de Lyon,<sup>5</sup> em 1961: a cromatina sexual poderia ser herdada de modo paterno ou materno, em diferentes células do mesmo animal, e geneticamente inativada em estágios precoces do desenvolvimento embrionário.

## Evolução

A inativação do cromossomo X é randômica em mamíferos eutérios, mas em marsupiais, por exemplo, o cromossomo X paterno é sempre o inativado.<sup>6</sup> A complexidade do mecanismo de inativação do cromossomo X em humanos está relacionada ao processo evolutivo, ainda que em outras espécies, algumas evolutivamente distantes do homem, também exista um mecanismo semelhante para a equalização da dosagem gênica, como em *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Caenorhabditis elegans*. No caso da *Drosophila*, a expressão dos genes presentes no cromossomo X dos machos é duas vezes maior quando compara-

da à das fêmeas, enquanto que no *C. elegans* as fêmeas têm uma expressão reduzida em relação à dos machos.<sup>7</sup>

As diferenças sexuais nos eucariotos superiores tiveram origem em sucessivas mudanças genéticas, como alterações cromossômicas acumuladas ao longo do processo evolutivo. Os cromossomos sexuais teriam evoluído de uma região homomórfica, de um par de cromossomos, que progressivamente se tornou heteromórfica.<sup>8</sup> Uma das evidências para essa afirmativa reside no fato de que o cromossomo Y possui um menor número de genes (cerca de 100), enquanto o cromossomo X possui um pouco mais de 1.000 genes.

## Mosaicismo

A inativação do cromossomo X origina duas populações de células, cada uma com um cromossomo X ativo, de origem parental diferente, de modo que as heterozigotas expressem genes ligados ao cromossomo X em um padrão de mosaico. Dessa forma, algumas células expressam os alelos do cromossomo X do pai, enquanto outras expressam os alelos herdados da mãe. Esse mosaicismo pode ser observado em diferentes células e tecidos femininos, sendo importante para a diversidade fisiológica entre ambos os sexos. Adicionalmente, o mosaicismo contribui para uma maior vulnerabilidade biológica nos homens, em relação às doenças ligadas ao cromossomo X. Em algumas dessas doenças, como, por exemplo, na doença de Fabry, as heterozigotas podem apresentar quadros clínicos bem diversos, dependendo do padrão da inativação do cromossomo X.

## Mecanismo de inativação do cromossomo X

Os passos para a inativação do cromossomo X podem ser divididos em: contagem, escolha, iniciação, estabelecimento e manutenção. Todos esses passos são controlados geneticamente e de maneiras distintas.<sup>9,10</sup> O principal local de controle da inativação do cromossomo X é conhecido como *XIC/Xic* (centro da inativação do cromossomo X), estando localizado em Xq13.2 em humanos e na

região D em camundongos. O *Xic* possui pelo menos quatro genes que participam desse processo: *Xist*, *Brx*, *Tsix* e *Cdx4*. A escolha de qual cromossomo X será inativado usualmente é randômica em embriões de mamíferos e parece estar sob um complexo mecanismo regulador de vários genes.<sup>11</sup>

O mecanismo de inativação do cromossomo X é iniciado a partir do *Xic*, se dispersando de modo bidirecional ao longo do cromossomo X.<sup>12</sup> As principais funções de *XIC/Xic* incluem a determinação de quais e quantos cromossomos X serão inativados. De modo significativo, *Xic* não é somente o local de controle da inativação do cromossomo X, mas tem o importante papel de proteger o futuro cromossomo X ativo de ser silenciado; talvez por isso, o mecanismo de inativação somente inicie com a presença dos dois “Xics”.<sup>9</sup>

Além do mecanismo da inativação, existe a compensação da dosagem gênica entre os cromossomos X. Esse segundo mecanismo é mediado por um complexo proteico que inclui um transcrito de RNA não codificante chamado de *Xist* (fator específico de transcrição do cromossomo X inativo). Em estágios muito precoces do desenvolvimento embrionário, os dois cromossomos X estão ativos, e *Xist* pode ser identificado em ambos.<sup>13</sup> Com o silenciamento de um dos cromossomos X, *Xist* é transcrito somente no cromossomo X inativo. O controle de *Xist* é realizado por outro gene, o *Tsix* (fator específico de transcrição antissenso do cromossomo X inativo), que é transcrito de modo antissenso a ele.<sup>14</sup> Adicionalmente, outros elementos parecem ser fundamentais, como o locus *DxPas34*, que atua conjuntamente com o *Tsix*, participando do controle da regulação da inativação e provavelmente do mecanismo de *imprinting* e da escolha do cromossomo X.<sup>3</sup>

As duas regras básicas da inativação do cromossomo X são:

- existe um único cromossomo X ativo nas células diploides em ambos os sexos, independente do número de cromossomos X de cada célula;
- independente da origem parental, um dos cromossomos X será inativado.

O maior dogma da inativação em humanos reside no fato de que a contagem dos cromos-

somos X é o primeiro passo, sendo essencial para o mecanismo de compensação da dosagem gênica.<sup>3,15,16</sup> Migeon<sup>4</sup> sugere que a presença de um único cromossomo X ativo é decorrente do fato de que existe um repressor de *Xist* presente nos autossomos. Isso é corroborado pela observação de que a deleção do gene *Xist* não interfere na escolha do cromossomo X ativo, da mesma forma que mutações nesse gene não influenciam na seleção do cromossomo X ativo, mas sim no processo de inativação em si.

Embora a inativação seja reconhecidamente um processo irreversível, a reativação do cromossomo X pode ser encontrada de forma programada nos oócitos durante a sua maturação, sendo estas as únicas células que possuem esse mecanismo de forma natural. No entanto, em tumores ou em idade avançada, pode ocorrer a reativação de genes ligados ao cromossomo X,<sup>17</sup> sugerindo que esta reativação esteja envolvida com a perda das “marcas epigenéticas”.<sup>6</sup>

## Regiões pseudoautossômicas

Existem regiões localizadas nos cromossomos X e Y que realizam troca de material genético (*crossing-over*), conhecidas como regiões pseudoautossômicas. As duas regiões pseudoautossômicas são a PAR1 (presente no braço curto dos cromossomos X e Y) e a PAR2 (localizada no braço longo de ambos os cromossomos X e Y). Os genes da região PAR1 estão expressos em ambos os cromossomos X; entretanto, a região PAR2, diferentemente de PAR1, não participa da meiose e nem todos os seus genes são expressos em ambos os cromossomos sexuais.<sup>4</sup>

## Genes que escapam da inativação

Segundo Talebizadeh e colaboradores,<sup>18</sup> cerca de 25% dos genes ligados ao cromossomo X podem escapar da inativação, estando a maioria deles localizada no braço curto do cromossomo X. Carrel e Willard<sup>19</sup> apoiam a ideia de que 15% dos genes ligados ao cromossomo X escapam da inativação em algum grau. Adicionalmente, 10% dos genes ligados

ao cromossomo X têm um padrão de inativação variável, apresentando graus de expressão gênica diversos no cromossomo X inativo. Os autores acreditam que esses genes que escapam ou que são expressos a partir do cromossomo X inativo possivelmente sejam contribuidores para as distorções sexuais, para as diferenças fenotípicas entre as mulheres heterozigotas nas condições ligadas ao cromossomo X, e para as anormalidades clínicas nos pacientes portadores de alterações cromossômicas do X.<sup>18</sup>

## Identificação do padrão de inativação do cromossomo X

As mulheres são heterozigotas para os genes presentes no cromossomo X e possuem polimorfismos que estão amplamente dispersos de maneira distinta em cada cromossomo X. A determinação do padrão de inativação do cromossomo X em heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X é importante para um melhor entendimento da patogênese de uma determinada doença, bem como para a realização de aconselhamento genético. Vários métodos de avaliação do padrão de inativação do cromossomo X estão descritos na literatura.

As técnicas mais utilizadas atualmente são as que realizam a pesquisa de polimorfismos no gene do receptor de andrógeno humano (*HUMARA*).<sup>20-23</sup> Esse gene está localizado em Xq12, sendo altamente polimórfico, contendo de 11 a 31 repetições CAG no primeiro éxon. Cerca de 90% das mulheres na população em geral são heterozigotas para esses polimorfismos. A investigação do padrão de inativação do cromossomo X somente é possível nas mulheres que apresentam dois alelos diferentes (heterozigotas), através da digestão do DNA utilizando uma enzima de restrição metilação-sensível como, por exemplo, a *Hpa II*. Essa enzima não irá digerir os alelos metilados e, portanto, inativos. Em uma segunda etapa, é realizada a amplificação da região por PCR (reação em cadeia de polimerase); após a eletroforese, os picos resultantes determinam a taxa de desvio. A taxa de intensidade do sinal é diretamente relacionada à quantidade de produto de PCR produzido. Se a inativação for randômica, a paciente apresentará o mesmo

número de alelos paternos e maternos metilados,<sup>20</sup> não apresentando desvio do padrão de inativação do cromossomo X. A principal limitação dessa técnica parece residir no fato de que a enzima pode não ser tão sensível e os alelos inativos nem sempre estão suficientemente metilados em todas as células para resistirem à digestão,<sup>24</sup> levando a uma subestimativa do grau verdadeiro do desvio da inativação.<sup>25</sup>

O padrão de inativação do cromossomo X segue a distribuição da Curva de Gauss na população das mulheres normais.<sup>26,27</sup> No entanto, esse padrão pode variar entre os indivíduos e também no mesmo indivíduo, podendo apresentar diferenças nos tecidos e nas células.<sup>28,29</sup>

É esperada a proporção de 50:50 de células que contenham o cromossomo X paterno:materno nas mulheres que apresentam a inativação.<sup>30,31</sup> Embora não se tenha um consenso do valor do desvio da inativação do cromossomo X considerado como anormal, na maioria dos estudos se situa entre >80:20 ou <80:20.<sup>24</sup>

Há uma limitação na interpretação dos resultados da maioria das técnicas de identificação da inativação do cromossomo X. Isso se deve ao fato de as células sanguíneas serem as mais estudadas, por serem de fácil acesso, mas apresentarem um alto grau de reposição, o que confere uma possibilidade maior de seleção celular e, dessa forma, o grau de desvio pode estar sendo subestimado. O ideal seria realizar estudos de expressão gênica ou de RNA.<sup>4</sup>

## As alterações cromossômicas sob o ponto de vista da inativação do cromossomo X

Serão discutidos apenas os aspectos ligados à inativação do cromossomo X, já que as alterações já foram detalhadas no Capítulo 9.

### Alterações numéricas

#### *Klinefelter (47,XXY)*

Os pacientes portadores da síndrome de Klinefelter apresentam fenótipo masculino,

com as seguintes características: hipogonadismo hipergonadotrófico, infertilidade, testículos pequenos, oligospermia e ginecomastia, aumento da estatura e alterações variáveis do comportamento. Nesses pacientes, a inativação do cromossomo X ocorre de modo a respeitar a principal regra da inativação. Dessa maneira, os pacientes apresentam somente um cromossomo X ativo. É provável que os genes da região pseudoautosômica e outros genes que são transcritos no cromossomo X inativo também sejam responsáveis por algumas das anormalidades somáticas nos pacientes com essa síndrome. A superexpressão do gene *SHOX* (*short stature homeobox*), por exemplo, pode ser responsável pelo aumento da estatura nesses pacientes.<sup>4</sup>

#### *Triplo X (47,XXX)*

Embora não exista um fenótipo típico, algumas características podem ser observadas: estatura acima da média, atraso da linguagem e alterações do esmalte dentário. O aumento da estatura se deve à superexpressão do gene *SHOX*, e as alterações do esmalte dentário são devidas ao gene *AMELX* (*amelogenesis imperfecta 1, X-linked*). Em relação à inativação do cromossomo X, somente um cromossomo é ativo, enquanto os outros dois se mantêm inativados como em qualquer conjunto diploide celular.

#### *Síndrome de Turner (45,X)*

A síndrome de Turner é caracterizada principalmente por baixa estatura, cardiopatia, amenorreia, cabelos em tridente e pescoço alado. Na síndrome de Turner, as alterações somáticas também são decorrentes da superexpressão ou subexpressão dos genes homólogos que são transcritos dos cromossomos X inativos e do Y. Como exemplo, podemos citar os genes da *PAR1*, que codificam proteínas envolvidas em muitos processos, incluindo a formação dentária e a estatura.

#### *Poliploides*

Os embriões triploides podem apresentar mais de um cromossomo X ativo. Na tetra-

ploidia, os embriões têm 92 cromossomos (92,XXXX ou 92,XXYY) e, assim como os triploides, podem apresentar dois cromossomos X ativos.<sup>32</sup>

Como podemos observar, as regras da inativação do cromossomo X são diferentes nas células diploides e nas poliploides, embora o processo seja basicamente o mesmo. Existem duas explicações prováveis:

- se os embriões tetraploides são formados na mitose, após a inativação do cromossomo X eles apresentam dois cromossomos X ativos devido à duplicação em cada conjunto diploide ou,
- dois X permanecem ativos devido à quantidade adicional de produtos gênicos presente, decorrente do conjunto extra de autossomos.<sup>4</sup>

### Trissomias autossômicas

Existe um tipo específico de mosaicismismo que está confinado à placenta, podendo ter origem meiótica de um feto originalmente trissômico, que perde precocemente um cromossomo extra durante o desenvolvimento embrionário. Como consequência, ocorre a formação de uma placenta com mosaicismismo cromossômico e/ou um feto com alterações cromossômicas.<sup>33,34</sup> Outra origem possível desse mosaicismismo é através da duplicação de um cromossomo da linhagem placentária de um feto diploide normal. O mosaicismismo confinado à placenta é detectado em aproximadamente 2% das gestações entre 10 e 12 semanas, sendo mais frequente em associação com fetos trissômicos, como, por exemplo, na trissomia do cromossomo 21. Um feto diploide oriundo do “resgate trissômico” pode apresentar desvio da inativação do cromossomo X.<sup>33</sup> Mesmo que exista recuperação da dissomia após a inativação do cromossomo X, todas as células derivadas terão o mesmo cromossomo X ativo.

Beever e colaboradores<sup>35</sup> sugerem associação específica do desvio da inativação do cromossomo X com gestações trissômicas. Entre as consequências do mosaicismismo confinado à placenta nessas gestações estão: abortamento espontâneo, retardo de crescimento intrauterino e aumento da morbidade perinatal.<sup>36</sup>

## Alterações estruturais do cromossomo X

### Anel do cromossomo X

A maioria dos pacientes que apresentam anel do cromossomo X possui fenótipos mais brandos porque usualmente a anormalidade ocorre no cromossomo X inativo. Adicionalmente, esses pacientes podem apresentar células normais, conferindo um padrão em mosaico. Quando ocorre uma duplicação ou deleção de segmentos do cromossomo X, como, por exemplo, na presença do cromossomo X em anel, o cromossomo X anormal sempre será o inativado.<sup>37,38</sup>

Nos casos que apresentam o quadro clínico mais grave, a etiologia parece ser decorrente da falência na compensação de dose, podendo não ocorrer a inativação de genes presentes no cromossomo X em anel.<sup>5</sup> Como consequência, esses genes serão funcionalmente dissômicos e ambas as cópias serão transcritas.<sup>39</sup> Dependendo do tamanho do anel do cromossomo X, pode ocorrer a perda do gene *XIST*, o que parece estar correlacionado com o fenótipo.<sup>39,40</sup> Um fenótipo associado à presença do cromossomo X em anel de tamanho menor já foi descrito, incluindo comprometimento mental e baixa estatura.<sup>38</sup>

Segundo Migeon e colaboradores,<sup>41</sup> um fenótipo grave associado à presença do anel do cromossomo X poderia ser explicado pelo fato de que:

- esse cromossomo X não foi inativado;
- existe uma mutação que afeta a inativação do cromossomo X, e
- o fenótipo é devido à dissomia funcional, resultado da ausência de compensação de dose dos genes presentes no anel do cromossomo X.

Entretanto, Turner e colaboradores<sup>39</sup> descreveram pacientes sem o fenótipo grave na presença do anel do cromossomo X e sugeriram as seguintes possibilidades:

- sequências que, quando funcionalmente dissômicas, são responsáveis pelo fenótipo mais grave e podem não estar presentes no cromossomo X em anel;

- a distribuição dos cromossomos X em anel pode apresentar diferenças entre os tecidos e sua correlação com a clínica, ou
- o cromossomo em anel do cromossomo X inativo foi formado após o estabelecimento da inativação.

Além do tamanho do anel do cromossomo X, outros fatores que parecem influenciar no fenótipo entre os seus portadores são origem parental do cromossomo X em anel e mosaicismos.<sup>38</sup>

## Deleção parcial do cromossomo X

Estudos de replicação tardia dos cromossomos indicam que, quando se tem perda de grandes blocos de genes, estes localizam-se no cromossomo X inativo, pois, se a inativação ocorresse no cromossomo X normal, tais genes não teriam nenhuma cópia ativa, inviabilizando a sobrevivência desta célula.<sup>4</sup>

## Translocações do cromossomo X com autosomos

Uma mulher que apresente uma translocação balanceada entre o cromossomo X e um autossomo pode:

- ser normalmente fértil;
- apresentar disgenesia gonadal;
- apresentar múltiplas anomalias congênicas e retardo mental, mais frequentemente sem disfunção gonadal, ou
- ser afetada por uma doença ligada ao cromossomo X.

Nas translocações balanceadas, o cromossomo X normal está preferencialmente inativado, pois, se as células inativassem o cromossomo derivado da translocação, os genes autossômicos também seriam inativados e a célula não sobreviveria.<sup>42</sup> Esse padrão não randômico de inativação do cromossomo X é decorrente da seleção da população celular inicial entre as células com a translocação e as células normais. Também se acredita na existência de uma seleção contra o cromossomo derivado da translocação, decorrente principalmente da dissomia funcional do cromossomo X e dependente da posição da quebra cromossômica e do tamanho da região não inativada.<sup>43</sup>

As heterozigotas portadoras de translocações entre o cromossomo X e um autossomo poderão apresentar sintomas quando:

- uma translocação não balanceada alterar os genes ligados ao cromossomo X;
- a perda do mosaicismos nas mulheres mascarar uma mutação no cromossomo X translocado, ou
- deleções no cromossomo X eliminarem o mosaicismos.<sup>4</sup>

## Referências

1. Puck JM, Stewart CC, Nussbaum RL. Maximum-likelihood analysis of human T-cell X-chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* 1992 Apr;50(4):742-8.
2. Migeon BR, Kennedy JF. Evidence for the inactivation of an X chromosome early in the development of the human female. *Am J Hum Genet.* 1975 Mar;27(2):233-9.
3. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001 Jan;2(1):59-67.
4. Migeon BR. Females are mosaics: X inactivation and sex differences in disease. New York: Oxford University Press; 2007.
5. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961 Apr 22;190:372-3.
6. Heard E, Distech CM. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev.* 2006 Jul 15;20(14):1848-67.
7. Lewin B. Nucleossomos. In: Lewin B, editor. *Tratado de genética e biologia molecular.* Porto Alegre: Artmed; 2001.p.574-86.
8. Distech CM. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.* 1995 Jan;11(1):17-22.

9. Rastan S, Robertson EJ. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol*. 1985 Dec;90:379-88.
10. Lee JT, Strauss WM, Dausman JA, Jaenisch R. A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell*. 1996 Jul 12;86(1):83-94.
11. Clerc P, Avner P. Random X chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Jun;16(3):246-53.
12. Russel LB. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and region of origin. *Science*. 1963 May 31;140:976-8.
13. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):325-37.
14. Stavropoulos N, Lu N, Lee JT. A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10232-7.
15. Kay GF, Barton SC, Surani MA, Rastan S. Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine Xist expression in early mouse development. *Cell*. 1994 Jun 3;77(5):639-50.
16. Lee TJ. Regulation of x-chromosome counting by tsix and xite sequences. *Science*. 2005 Jul 29;309(5735):768-71.
17. Spatz A, Borg C, Feunteun J. X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):617-29.
18. Talebizadeh Z, Simon SD, Butler MG. X chromosome gene expression in human tissues: male and female comparisons. *Genomics*. 2006 Dec;88(6):675-81.
19. Carrel L, Willard HF. X inactivation profile reveals extensive variability in X linked gene expression in females. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):400-4.
20. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992 Dec;51(6):1229-39.
21. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
22. Allen RC, Nachtman RG, Rosenblatt HM, Belmont JW. Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet*. 1994 Jan;54(1):25-35.
23. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.
24. Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M. A new assay for the analysis of X chromosome based on methylation-specific PCR. *Hum Genet*. 1999 Jan;104(1):49-55.
25. Kim JW, Park SY, Kim YM, Kim JM, Han JY, Ryu HM. X-chromosome inactivation patterns in Korean women with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *J Korean Med Sci*. 2004 Apr;19(2):258-62.
26. Migeon BR. Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;80(1-4):142-8.
27. Bittel DC, Theodoro MF, Kibirveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet*. 2008 May;45(5):309-13.
28. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet*. 2000 Oct;107(4):343-9.
29. Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring humans. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):333-41.
30. Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*. 1983;17:155-90.
31. Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood*. 1988 Nov;72(5):1735-9.
32. Wutz A, Gribnau J. X inactivation Xplained. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Oct;17(5):387-93.
33. Lau AW, Brown CJ, Peñaherrera M, Langlois S, Kalousek DK, Robinson WP. Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. *Am J Hum Genet*. 1997 Dec;61(6):1353-61.
34. Kline J, Kinney A, Levin B, Kelly A, Yu CY, Brown S, Warburton D. X-chromosome inactivation and ovarian age during the reproductive years. *Fertil Steril*. 2006 May;85(5):1488-95.
35. Beever CL, Stephenson MD, Peñaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, et al. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion of chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):399-407.



36. Kalousek DK. Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development. *Placenta*. 1994 Apr;15(3):219-30.
37. Van Dyke DL, Wiktor A, Palmer CG, Miller DA, Witt M, Babu VR, et al. Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. *Am J Med Genet*. 1992 Aug 1;43(6):996-1005.
38. Tomkins DJ, McDonald HL, Farrell SA, Brown CJ. Lack of expression of XIST from a small ring X chromosome containing the XIST locus in a girl with short stature, facial dysmorphism and developmental delay. *Eur J Hum Genet*. 2002 Jan;10(1):44-51.
39. Turner C, Dennis NR, Skuse DH, Jacobs PA. Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet*. 2000 Jan;106(1):93-100.
40. Wolff DJ, Brown CJ, Schwartz S, Duncan AM, Surti U, Willard HF. Small marker X chromosomes lack the X inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 1994 Jul;55(1):87-95.
41. Migeon BR, Luo S, Jani M, Jeppesen P. The severe phenotype of females with tiny ring X chromosomes is associated with inability of these chromosomes to undergo X inactivation. *Am J Hum Genet*. 1994 Sep;55(3):497-504.
42. Gupta N, Goel H, Phadke SR. Unbalanced X; autosome translocation. *Indian J Pediatr*. 2006 Sep;73(9):840-2.
43. Gläser B, Shirneshan K, Bink K, Wirth J, Kehrer-Sawatzki H, Bartz U, et al. Molecular cytogenetic analysis of a de novo balanced X;autosome translocation: Evidence for predominant inactivation of the derivative X chromosome in a girl with multiple malformations. *Am J Med Genet A*. 2004 Apr 30;126A(3):229-36.

## Leituras recomendadas

- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000 Mar 22;9(5):695-702.
- Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood*. 1988 Nov;72(5):1735-9.
- Hall J. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet*. 1990 May;46(5):857-73.
- Ogata T, Muroya K, Matsuo N, Shinohara O, Yorifuji T, Nishi Y, et al. Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Nov;86(11):5498-508.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974 Sep 13;251(5471):156-8.
- Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest*. 1987 May;79(5):1395-400.
- Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet*. 1992 Jan 15;42(2):161-9.
- Turner C, Dennis NR, Skuse DH, Jacobs PA. Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet*. 2000 Jan;106(1):93-100.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, et al. Clonal Analysis Using Recombinant DNA Probes from the X-Chromosome. *Cancer Res*. 1987 Sep 15;47(18):4806-13.

Fabiana Michelsen de Andrade

# Imprinting e dissomia uniparental

## Introdução

A assimetria funcional de genomas de mamíferos foi demonstrada pela primeira vez na década de 1980, por experimentos de transplantes nucleares e testes de complementação genética.<sup>1-3</sup> Por meio destes experimentos, foi determinado que, em organismos diploides, apesar da extensa homologia genética ao longo dos pares de cromossomos, em muitos casos o genoma paterno não possui exatamente a mesma função do genoma materno e, portanto, nestes casos não são necessárias duas cópias, mas somente uma cópia ativa para que o fenótipo seja normal. Assim, estas regiões genômicas de organismos normais, portadores de um cromossomo de cada genitor, não possuem dois alelos ativos – ao contrário, um dos alelos está silenciado por um fenômeno molecular denominado *imprinting* genômico. Dependendo da região em questão, o padrão normal de *imprinting* é o silenciamento do alelo materno, enquanto, em outras regiões, ocorre o silenciamento do alelo paterno. Desta maneira, qualquer evento que modifique este padrão de marcação poderá alterar o fenótipo do organismo. Um dos eventos relacionados com a modificação do padrão correto de expressão gênica destes *loci* é o fenômeno denominado dissomia uniparental (UPD, de *uniparental dissomy*), definida como a herança de ambos os homólogos de um par de cromossomos a partir de somente um genitor. Apesar de se tratarem de fenômenos completamente independentes, a existência de UPD para um par de cromossomos que possua alguma região com *imprinting* diferencial de acordo com a origem do cromossomo pro-

vocar a existência de dois cromossomos do mesmo genitor, alterando o padrão de expressão normal. Assim, o fenômeno de dissomia proporcionou a descoberta de várias regiões de *imprinting* genômico, mas é importante lembrar que não existe nenhum problema com o padrão normal de *imprinting* nos casos de dissomia, as consequências clínicas são devidas ao erro na origem do cromossomo, e não devido a um erro de *imprinting* na região homóloga. Além disso, a UPD por si só não causa um fenótipo alterado em todos os portadores, uma vez que alguns cromossomos não possuem regiões com padrões de *imprinting* diferenciais, o que não provoca nenhuma diferença fenotípica ocasionada pela presença de dois cromossomos do mesmo genitor, em comparação ao par normal. Assim, neste capítulo, estes fenômenos serão inicialmente conceituados de maneira independente e, posteriormente, será discutida a relação existente entre eles, com ênfase nos principais efeitos clínicos conhecidos até o momento.

## Imprinting genômico

O termo *imprinting* genômico está relacionado à ocorrência de modificações epigenéticas que resultam em conformações de cromatina específicas para o alelo “imprimado” que, embora não modifiquem a sequência de bases do genoma, controlam a expressão gênica. Em 1942, Waddington<sup>4</sup> definiu pela primeira vez o termo epigenética: a ideia de que cada fenótipo nasce do genótipo por uma modificação programada. Atualmente, a moderna definição de epigenética seria a de “informação herdável durante a divisão celular, que não seja

propriamente a sequência de bases de DNA". No entanto, tem se tornado cada vez mais claro que existe uma grande sobreposição entre estas duas definições, uma vez que processos do desenvolvimento são regulados por epigenética, pois diferentes tipos celulares se mantêm diferenciados ao longo de ciclos de divisão celular, mesmo que suas sequências de DNA sejam idênticas. Vários defeitos no epigenoma são conhecidos como causas de doenças, incluindo mudanças na densidade localizada ou global de metilação de DNA e modificações incorretas de histonas.<sup>5</sup>

O termo epigenética se refere a modificações da cromatina que, embora não afetem a sequência do DNA, resultam na regulação da expressão gênica. Estas modificações são estavelmente herdadas pela mitose e, em alguns casos, pela meiose, sendo cruciais para o desenvolvimento, pois permitem a diferenciação de tipos celulares.<sup>6</sup> Além do *imprinting* de algumas regiões do genoma, modificações epigenéticas também são responsáveis pela inativação do cromossomo X. Mudanças epigenéticas também ocorrem em processos patológicos envolvidos no câncer e em outras doenças.<sup>7</sup> A marca epigenética mais estudada é a metilação de DNA em resíduos de citosina de dinucleotídeos CpG, dentro de promotores, transposons e regiões "imprimadas".<sup>8</sup> Além disso, nestas regiões também ocorrem modificações em histonas, como metilações e acetilações, e estas modificações regulam em conjunto a conformação da cromatina, regulando assim a atividade transcricional ou o silenciamento de regiões genômicas específicas.<sup>6</sup>

Ilhas CpG são distribuídas diferencialmente em diferentes classes de sequências e em genes "imprimados"; uma ilha CpG adicional conhecida como região de controle de *imprinting* (RCI) frequentemente está localizada a alguma distância do promotor e é crucial na regulação do gene. A RCI possui um *imprinting* com uma cópia sendo metilada de maneira específica de acordo com a origem paterna ou materna, motivo pelo qual também é denominada região diferencialmente metilada, ou RDM.<sup>9</sup>

Genes "imprimados" geralmente estão localizados em *clusters* fisicamente ligados, que podem ocupar vários quilobases e conter tanto genes "imprimados" quanto não "imprimados". Desta maneira, a expressão gênica em uma dada região cromossômica é coordenada.

Genes que sofrem este tipo de modificação epigenética diferem da maioria dos genes de mamíferos no sentido de que, embora também sejam herdados em cópia dupla, somente um alelo é expresso. Para alguns genes "imprimados", o alelo preferencialmente expresso é o alelo paterno, e estes genes são conhecidos como genes paternalmente expressos. Logicamente, aqueles genes com expressão preferencial materna são denominados genes maternalmente expressos. Atualmente, em torno de 100 genes "imprimados" no homem ou em camundongo são conhecidos, um assunto que pode ser revisado *online* no site *Catalogue of Parent of Origin Effects*.<sup>10</sup> Embora exista um número pequeno de trabalhos disponíveis sobre este assunto, dados iniciais sugerem que estes genes possuem uma grande importância em termos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação da função orgânica.<sup>11</sup>

## Genes controlados epigeneticamente sofrem reprogramação da metilação na linhagem germinativa

Uma vez que, após a fecundação, o embrião é portador de um genoma paterno, com algumas regiões específicas silenciadas, e de um genoma materno, com outras regiões específicas silenciadas, é essencial que antes do início da formação de seus gametas (masculinos ou femininos) estas marcas sejam apagadas para que os gametas carreguem somente o padrão de *imprinting* do sexo do embrião.<sup>9</sup> Assim, o mecanismo de *imprinting* deve envolver um ciclo de eventos: marcas de *imprinting* são apagadas antes da formação das células que originarão as germinativas, sendo então re-estabelecidas em células germinativas do embrião em desenvolvimento, de acordo com o seu sexo.<sup>12,13</sup>

Estudos preliminares nas primeiras fases de desenvolvimento do embrião sugerem a existência de uma onda de desmetilação nas fases anteriores à implantação. Aparentemente, o genoma paterno sofre desmetilação ativa no zigoto, enquanto o genoma materno perde os radicais metil passivamente a cada divisão celular, até o estágio de blastocisto. Após a implantação, todas estas sequências começam a se tornar novamente metiladas.

No entanto, em casos de genes “imprintados” diferencialmente de acordo com a origem do genitor, é essencial que, após a fertilização, eles escapem parcialmente da onda de desmetilação, de maneira que permaneça ao menos um sinal de origem de cada alelo, para que, quando os genes se tornarem transcritionalmente ativos nas células somáticas, somente a cópia correta funcione.

Na linhagem germinativa masculina, existe um número muito pequeno de genes que sofrem metilação, sendo que o melhor investigado é o H19. Após o apagamento da metilação, as células germinativas ainda são diploides e, portanto, contêm duas cópias de cada gene. Assim, neste estágio, ambas as cópias devem ser metiladas, para garantir que cada espermatozoide haploide seja corretamente “imprimado”. Estudos com o gene H19 demonstram que, embora suas duas cópias tenham tido seu padrão prévio de metilação apagado, aparentemente ainda contêm alguma outra marca epigenética não identificada. Em camundongos, isto é demonstrado uma vez que o alelo paternalmente herdado é remetilado muito mais rápido que o alelo materno: a metilação do primeiro ocorre até o 155º dia de vida embrionária, enquanto a do segundo não está completa até o nascimento. Apesar desta diferença, ambos os alelos estão metilados antes do início da meiose.

Diferentemente do que acontece na linhagem germinativa masculina, genes “imprintados” de origem materna não são completamente metilados até o final da fase de paquíteno, na meiose I, que ocorre no ovócito em crescimento, no estágio pós-natal. O nível de metilação está correlacionado com o tamanho do ovócito, ocorrendo gradualmente desde o início do crescimento. Para ao menos três genes metilados na linhagem germinativa materna (Snrpn, Zac1 e Peg1), o alelo herdado maternalmente parece ser metilado antes do herdado paternalmente, demonstrando mais uma indicação de outra marca epigenética nestes genes, que permite a diferenciação dos alelos de acordo com sua origem.

Os mecanismos para a desmetilação em mamíferos ainda não foram confirmados, e nenhuma atividade reproduzível de desmetilação foi identificada. Portanto, o debate sobre o mecanismo de apagamento do *imprinting* continuará até a demonstração de uma reação

enzimática que possa catalisar o processo de desmetilação.<sup>9</sup>

## Vantagem evolutiva do *imprinting* genômico

Como um alelo é sempre silenciado em genes “imprintados”, estes são especialmente sensíveis a mutações que causam a perda total da função alélica. Segundo a analogia feita por Hurst,<sup>14</sup> é como se estes genes fossem um avião voando com somente um motor. Esta grande vulnerabilidade é até mais difícil de compreender quando o papel crucial destes genes na fisiologia é lembrado. A conclusão lógica a que se chega para este fenômeno é que o *imprinting* deve ocasionar algum tipo de vantagem evolutiva, que seria maior que o custo para sua manutenção e que as potenciais consequências danosas de sua disfunção.<sup>11</sup>

Um grande número de teorias tem sido proposto para explicar a vantagem do *imprinting*. Muitas destas teorias explicam aspectos importantes disponíveis, mas nenhuma pode explicar todos os achados até o momento.<sup>15</sup> Aparentemente, a teoria mais consistente é a chamada teoria do conflito, que propõe que o *imprinting* teria evoluído a partir de alguma assimetria de relações entre os gêneros. No caso de mamíferos polígamos, machos tendem a entrar em grupos sociais rapidamente, deixar prole, e então abandonar estes grupos. Como estes machos são indiferentes ao sucesso do futuro reprodutivo das fêmeas com as quais eles procriaram, os genes que eles doaram para a prole podem agir de maneira a retirar a maior quantidade de recursos (tanto no útero, quanto no período pós-natal) de suas mães, independente de causar algum prejuízo a elas. Por outro lado, como as mães são igualmente relacionadas a todas as suas proles, e podem ter várias gestações, existe uma grande necessidade de que os genes doados pela mãe garantam que toda a progênie receba igualmente a mesma quantidade de recursos, e isto pode ser atingido por restringir o crescimento de cada prole individualmente. Assim, existiria um conflito potencial entre genomas herdados paternalmente e maternalmente pela prole, e investigações com os primeiros genes “imprintados” identificados parecem fornecer subsídios para esta hipótese: o gene paternal-

mente expresso Igf2, por exemplo, promove o crescimento fetal, enquanto os genes matematicamente expressos H19 e Igf2r são responsáveis pela limitação do crescimento.<sup>16</sup>

## Regiões genômicas que sofrem *imprinting*: erros nos padrões de *imprinting* e relação com fenótipos alterados

### *Síndrome de Prader-Willi*

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é ocasionada por erros que envolvem genes “imprimados” na região 15q11-q13. Esta região contém um número de genes que mostram padrões de expressão dependentes da origem: alguns genes são expressos exclusivamente no cromossomo paterno, enquanto outros mostram expressão preferencial, ou expressão tecido-específica, de acordo com a origem do alelo. Outros genes dentro desta região são ativos em ambos os alelos, com nenhuma evidência de *imprinting*.

Os mecanismos de *imprinting* são complexos, envolvendo múltiplos genes marcados, sítios agindo em cis, fatores agindo em trans, além de RNAs não codificantes.<sup>16</sup> No cromossomo paterno, vários genes devem estar ativos nesta região, mas dois genes devem estar inativos (UBE3A e ATP10A). Neste cromossomo, a transcrição inicia no gene SNRPN, produzindo um transcrito único que inclui um RNA antissenso para o gene UBE3A. Acredita-se que este RNA atue em cis no próprio cromossomo para impedir a expressão dos genes UBE3A e ATP10A. Já no cromossomo materno normal, a situação se inverte: somente os genes UBE3A e ATP10A devem estar ativos, uma vez que os genes regulados pelo SNRPN estão inativados e, portanto, o RNA antissenso não é produzido. Assim, se o cromossomo paterno está presente e intacto, os genes normalmente são expressos a partir dele, ocasionando o fenótipo normal, ao contrário do que ocorre na SPW, na qual defeito genético relacionado ao fenótipo é a ausência de expressão de uma série de aproximadamente nove genes do cromossomo paterno, cuja transcrição é controlada pela região no éxon 1 do primeiro deles, SNRPN. Neste local, uma região rica em nucleotídeos CG, denominada centro de *imprin-*

*ting*, sofre metilação somente no cromossomo materno, o que impede a transcrição destes genes a partir deste cromossomo, mesmo que ele esteja presente e intacto.<sup>17</sup> O padrão normal de *imprinting* desta região está demonstrado na **Figura 11.1**.

Pacientes com SPW mostram hipotonia neonatal, hiperfagia na primeira infância levando à obesidade, hipogonadismo, baixa estatura, problemas de comportamento e retardo mental de médio a moderado. Esta característica possui múltipla etiologia, com aproximadamente 70% dos indivíduos sendo portadores de uma deleção de cerca de 6 Mb na região 15q11-q13, no cromossomo paterno, o que ocasiona a ausência da expressão de vários genes controlados pelo centro de *imprinting* localizados no éxon 1 do gene SNRPN. Somente 1% dos pacientes com SPW herda normalmente cromossomos 15 do pai e da mãe, mas o centro de *imprinting* do cromossomo 15 paterno está anormalmente metilado, carregando um padrão de *imprinting* materno. Por este motivo, o fenótipo associado é idêntico, uma vez que este defeito também impede a expressão dos genes localizados após o centro de *imprinting*. A maioria dos pacientes restantes (29%) possui dois cromossomos 15 de origem materna, o que causa a mesma síndrome devido à ausência da região 15q11-q13 de origem paterna, como será discutido na próxima seção deste capítulo.<sup>18</sup>

### *Síndrome de Angelman*

A região genômica relacionada à síndrome de Angelman (SA) é a mesma associada à SPW. No entanto, uma vez que no cromossomo materno os genes expressos na região 15q11-q13 são os genes UBE3A e ATP10A, para que o fenótipo seja específico da SA, estes genes devem estar afetados neste cromossomo. Investigações moleculares do centro de *imprinting* localizado no éxon 1 do gene SNRPN são essenciais para a diferenciação entre as cinco classes desta síndrome. As classes I a III são caracterizadas por ausência de metilação da região SNRPN e, portanto, este gene e todos os outros seguintes são expressos também a partir do cromossomo materno, o que provoca a produção do RNA anti-UBE3A e causa o silenciamento dos genes UBE3A e ATP10A também no cromossomo materno.



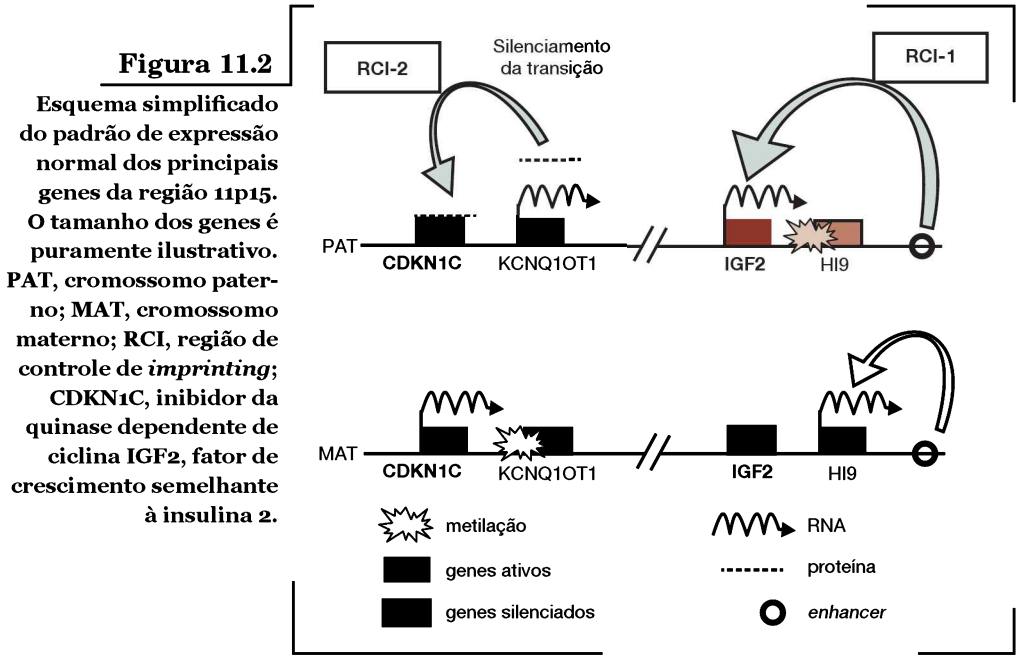
possuam no mínimo três das seguintes características: macrocefalia, retardo de crescimento pós-natal, assimetria corporal, severas dificuldades de alimentação ou baixo índice de massa corporal e testa proeminente.

Várias anormalidades citogenéticas já foram descritas em casos de SSR, incluindo principalmente os cromossomos 7 e 11, além de um número menor de casos com anomalias nos cromossomos 8, 15, 17 e 18.<sup>6</sup>

A região 11p15 contém dois domínios de genes “imprantados”, com duas regiões de controle de *imprinting* denominadas RCI-1 (metilada no alelo paterno) e RCI-2 (metilada no alelo materno). Este *cluster* contém genes cruciais para o controle do crescimento fetal, como aqueles expressos em cromossomos paternos que promovem o crescimento (p. ex., o gene IGF2, fator de crescimento semelhante à insulina 2, de *insulin-like growth factor 2*), e aqueles expressos em cromossomos maternos que inibem o crescimento (p. ex., o gene CDKN1C, inibidor 1C da quinase dependente de ciclina, de *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*). O padrão normal de *imprinting* desta região está demonstrado na **Figura 11.2**.

Utilizando critérios rígidos para o diagnóstico da SSR, foi encontrado que a perda da metilação na região RCI-1 do alelo paterno ocorre em mais de 60% dos casos, levando à superexpressão de uma proteína inibidora do gene IGF2, relacionado com a promoção do crescimento fetal. Esta epimutação não esteve presente em nenhum paciente com baixo peso ao nascer que não se enquadrasse nos critérios de SSR. Além disso, foi demonstrado que pacientes desta classe se encaixam em no mínimo quatro dos cinco critérios para SSR, possuindo um fenótipo mais grave do que aqueles pacientes que apresentam somente baixo peso ao nascer, ou que pacientes com SSR, e com a região 11p15 com o padrão normal de metilação. Além deste erro de metilação, alguns pacientes com SSR foram diagnosticados como sendo portadores de duplicações de 11p15 no cromossomo materno, levando ao mesmo aumento da expressão da proteína inibidora de IGF2.<sup>6,19</sup>

Um detalhe interessante na SSR é que praticamente todos os pacientes nos quais a causa está associada à região 11p15 possuem um padrão em mosaico para a hipometilação, que pode ser atribuído a erros pós-fertilização.



Clinicamente, este mosaicismismo é refletido por hemi-hipoplasia, que está presente na maioria destes pacientes. A origem pós-fertilização destas epimutações explicaria a alta taxa de discordância entre gêmeos com SSR, além da grande variabilidade fenotípica encontrada na síndrome.

Outras causas frequentes de SSR são aberrações no cromossomo 7, que incluem duplicações da região 7p11.2p13. Pesquisas nesta região genômica demonstraram que ela está muito próxima a um gene “imprimado” denominado GRB10 (proteína 10 ligante ao receptor de fator de crescimento, de *growth factor receptor bound protein 10*), além de vários *loci* codificantes para fatores também envolvidos no crescimento e desenvolvimento humanos. Outra região no mesmo cromossomo aparentemente relacionada à SSR é a 7q31, homóloga a uma região do cromossomo 11 do camundongo, possuindo importantes funções no crescimento. Epimutações nestas regiões não foram detectadas. No entanto, a presença de dois cromossomos 7 de origem materna, levando a modificações de expressão das regiões em questão, já foi detectada como sendo a causa de até 10% dos casos de SSR.

### Síndrome de Wiedemann-Beckwith

A síndrome de Wiedemann-Beckwith (SWB) é caracterizada por crescimento pré e/ou pós-natal superior ao percentil 90, além de macroglossia e defeitos da parede abdominal. Outras características possíveis são anormalidades umbilicais, dobras lineares do lóbulo, risco aumentado de tumores, e placentas com quase o dobro do peso normal. Além disso, controle glicêmico anormal na forma de hipoglicemia transitória de início precoce é uma característica variável, mas reconhecida desta condição.<sup>6,20</sup>

A etiologia genética da SWB é extremamente heterogênea, com a maioria dos casos sendo esporádicas. Os achados aparentemente opostos à SSR indicaram a direção das primeiras investigações e, de fato, o cromossomo 11 foi associado. A epimutação descrita em 11p15 para SSR é exatamente oposta àquela relacionado à SWB: cerca de 10% dos pacientes com SWB possuem um ganho de

metilação de origem materna na RCI-1. Além disso, a maior parte destes pacientes (60%) é caracterizada pela perda de metilação da RCI-2 de origem materna.<sup>6</sup> Dois cromossomos 11 de origem paterna são encontrados em 17% dos pacientes, e a SWB também está presente em portadores de duplicação da região 11p15 paterna.<sup>19</sup>

Defeitos epigenéticos são encontrados em uma frequência muito mais alta em distúrbios de crescimento relacionados à região 11p15 do que em outras desordens de *imprinting*, como a SA e a SPW, sugerindo que a organização da cromatina desta região é muito mais vulnerável que aquela de outras regiões “imprimadas”. O mecanismo preciso pelo qual ocorrem estas metilações aberrantes permanece desconhecido. Teoricamente, o defeito epigenético pode ocorrer durante o estabelecimento de *imprinting* em gametas, ou na manutenção do *imprinting* após a fertilização. Várias linhas de evidência indicam que a perda da metilação ocorre depois da fertilização e envolve fatores agindo em *trans* que regulam a manutenção das marcas epigenéticas alelo-específicas durante o desenvolvimento no período pré-implantação: o padrão de mosaicismismo dos defeitos epigenéticos; a alta incidência de gêmeos monozióticos discordantes para SWB e SSR; o risco aumentado de SWB (e talvez de SSR) em crianças geradas por tecnologias de reprodução assistida; e a perda de metilação afetando mais que o *locus* causador da doença em um subconjunto de pacientes com diferentes desordens de *imprinting*, como SWB e diabetes neonatal transitório.<sup>6</sup>

### Diabete neonatal transitório

O diabetes neonatal transitório (DNT) relacionado à região 6p24 é uma condição que inicia na primeira semana de vida, apresentando retardo do crescimento e hiperglicemia. A terapia com insulina é necessária para a normalização da glicemia na maior parte dos pacientes, e a remissão acompanhada da volta do ganho de peso ocorre por volta dos três meses. Embora o crescimento subsequente seja normal, uma proporção significativa dos indivíduos desenvolve diabetes na adolescência. Além destas características, alguns pacientes



manifestam hérnia umbilical, macroglossia e dificuldades de aprendizagem.

Os primeiros dois casos identificados com DNT possuíam dois cromossomos 6 paternos, e hoje se sabe que esta é a causa de até 40% dos casos. Além disso, em outros 40% dos pacientes ocorre a presença de duplicação da região 6q24 de origem paterna, e nos 20% restantes ocorre uma perda de metilação nesta região, no cromossomo materno. Cada um destes mecanismos resulta no aumento da expressão de um gene denominado ZAC, codificante para uma proteína com dedo de zinco que se localiza no núcleo e atua como um fator de transcrição. O papel deste gene, que se encontra “imprimado” em cromossomos 6 maternos, ainda não está claro, assim como de que forma a sua expressão aumentada resulta no fenótipo da DNT. No entanto, em camundongos, este defeito está associado a uma massa reduzida de células  $\beta$  pancreáticas no momento do nascimento, o que é compatível com os baixos níveis de insulina dosados em recém-nascidos afetados pela DNT.<sup>20</sup>

### *Osteodistrofia hereditária de Albright e pseudo-hipoparatiroidismos tipos 1A e 1B*

A osteodistrofia hereditária de Albright (OHA) e os pseudo-hipoparatiroidismos tipos 1A (PHP1A) e 1B (PHP1B) são distúrbios originados por defeitos na expressão de genes de um mesmo *cluster*, denominado *cluster* GNAS, pois seu principal gene possui esta sigla. Este *cluster* está localizado em 20q13 e gera múltiplas proteínas pela utilização de diferentes regiões promotoras e de *splicing* alternativo. O principal produto gênico se trata da subunidade  $\alpha$  da proteína G ( $G_s\alpha$ ), que é expressa ubiquamente e possui a capacidade de se acoplar a um grande número de receptores hormonais e transmembrana, um passo necessário para a produção intracelular de AMPc. O promotor que está relacionado com a síntese de  $G_s\alpha$  se encontra desmetilado em ambos os alelos na maior parte das células, apesar de ser “imprimado” de maneira tecido-específica: em tecidos-alvo de hormônios, é expresso a partir de alelos maternos.

Qualquer defeito genético que provoque a inativação do gene  $G_s\alpha$  está relacionado à OHA, uma síndrome caracterizada por obesidade, baixa estatura, braquidactilia, ossificações subcutâneas e déficits neurocomportamentais, que são características que não estão relacionadas aos tecidos nos quais o gene  $G_s\alpha$  é “imprimado”. Uma vez que o gene para  $G_s\alpha$  sofre *imprinting* tecido-específico, onde é expresso a partir do alelo materno, esta síndrome aparecerá de maneira isolada somente se o defeito de *imprinting* ocorrer no alelo paterno, pois causará o fenótipo devido a modificações de expressão gênica nos tecidos que normalmente não possuiriam o gene “imprimado” e teriam, portanto, uma produção dobrada da proteína  $G_s\alpha$ . Naqueles tecidos em que o gene  $G_s\alpha$  estaria normalmente “imprimado” no alelo paterno, o defeito genético nesse alelo não causa nenhuma alteração, pois este é o estado normal para o gene nestes tecidos, ou seja, a produção proteica ocorre somente a partir do alelo materno.

No entanto, uma vez que o padrão normal de expressão do gene  $G_s\alpha$  é expresso por ambos os alelos na maior parte dos tecidos, e somente pelo alelo materno em tecidos-alvo de hormônios, o mesmo defeito genético trará outros fenótipos, quando herdado no alelo de origem materna. A inativação do alelo materno, por diminuir a síntese proteica nos tecidos onde ela deveria ser dobrada, trará também o efeito de OHA. No entanto, em tecidos-alvo de hormônios, onde o alelo paterno já está “imprimado”, a inativação do alelo materno causará a não produção de  $G_s\alpha$ , ocasionando também a resistência de PTH, TSH e gonadotrofinas, um quadro que, em conjunto com a OHA, é denominado pseudo-hipoparatiroidismo tipo 1A (PHP1A).

Já o pseudo-hipoparatiroidismo tipo 1B (PHP1B) ocorre na ausência de OHA, sendo causado por mutações que inativam o gene  $G_s\alpha$  no alelo materno. Uma vez que a presença deste alelo é fundamental somente em tecidos-alvo de hormônios, pois o outro alelo nestes tecidos está “imprimado”, a inativação de ambos os alelos causa o fenótipo somente nestes tecidos. Uma vez que este gene não possui *imprinting* em outros tecidos, o alelo paterno normal supre a quantidade proteica necessária, e os sintomas relacionados à OHA não estarão presentes.<sup>21</sup>

## Fenótipo UPD(14) pat/mat-like relacionado à região 14q32.2

A região 14q32.2 contém um *cluster* de genes “imprantados”, que inclui genes expressos somente no cromossomo paterno (DLK1 e RTL1) e genes expressos somente no cromossomo materno (GTL2, RTL1as e MEG8). Até o momento, foram registrados 12 pacientes com microdeleções neste *cluster*, além de oito pacientes com epimutações.

Com base nos fenótipos destes pacientes, foi proposto que a expressão excessiva do gene RTL1 está relacionada ao fenótipo denominado *UPD(14)pat-like*, e que a expressão diminuída dos genes DLK1 e RTL1 é a causa do fenótipo denominado *UPD(14)mat-like*.

Assim, microdeleções ou epimutações que causem aumento da expressão do gene RTL1 causariam um fenótipo no qual estão presentes um tórax diminuído em formato de sino, defeitos da parede abdominal, poli-hidrânio, placentomegalia, atraso no desenvolvimento, além de uma face característica da síndrome. Já os mesmos problemas causando a diminuição de expressão dos genes DLK1 e RTL1 estão relacionados ao fenótipo com baixo peso ao nascer, baixa estatura, puberdade de início precoce, obesidade, mãos pequenas, hipotonia, atraso no desenvolvimento e face característica. Uma vez que existe um padrão de expressão que difere de acordo com a origem do cromossomo, em casos onde existirem dois cromossomos do mesmo genitor, a mesma síndrome estará presente, o que caracteriza a sua denominação de fenótipo *UPD(14)pat/mat-like*, devido ao fenômeno denominado dissomia uniparental, que será discutido mais adiante neste capítulo.<sup>22</sup>

## Reprodução assistida e erros no padrão de *imprinting*

Síndromes associadas ao aumento de crescimento foram relacionadas a técnicas de reprodução assistida (TRAs) pela primeira vez em animais domésticos como gado e ovelha. Notou-se que bezerros originados de procedimentos *in vitro* tinham maior tamanho e maiores taxas de morbi-mortalidade que

aqueles concebidos por inseminação artificial ou transferência de embriões.

Devido a limitações éticas, o efeito das TRAs sobre o padrão de *imprinting* em humanos não vem sendo bem investigado. No entanto, existem vários dados em modelos animais que sugerem que a TRA pode ter efeitos sobre o padrão de *imprinting*. Dados de Zaitseva e colaboradores,<sup>23</sup> que investigaram embriões de camundongo no período de vida de duas células, demonstraram que aqueles desenvolvidos *in vitro* tiveram níveis de metilação significativamente mais altos do que aqueles cultivados *in vivo*. Foi demonstrado que existe uma variação do status de *imprinting* de alguns genes, de acordo com o meio de cultura utilizado para o crescimento de embriões.<sup>24</sup> Além disso, o método utilizado para provocar superovulação também foi relacionado com o padrão de expressão de alguns genes “imprantados”.<sup>25</sup> Uma publicação recente demonstrou que até mesmo manipulações mínimas do embrião foram associadas à perda de metilação de alguns genes em camundongos.<sup>26</sup>

Com relação à injeção intracitoplasmática de esperma, uma investigação do padrão de metilação de genes específicos em esperma humano sugeriu uma associação entre *imprinting* genômico anormal e hipoespermatogênese.<sup>27</sup> Neste estudo, dentre os homens com contagens gaméticas normais, a taxa de anormalidade foi de 0%. Em células de homens com oligozoospermia moderada, a taxa de anormalidade foi de 17%; já entre aqueles com oligozoospermia severa, este valor aumentou para 30%.

Em humanos, com a descoberta do *imprinting* genético, foi levantada a suspeita de que TRAs poderiam teoricamente aumentar a chance de síndromes relacionadas a defeitos no padrão de *imprinting*. Os primeiros estudos neste sentido não foram capazes de estabelecer esta relação, o que seria esperado devido à raridade destes distúrbios e ao grande tamanho amostral necessário para a detecção de um aumento de risco associado à reprodução assistida.

A SA foi a primeira desordem relacionada ao *imprinting* a ser associada à reprodução assistida.<sup>28</sup> Desde então, um aumento de aparecimento desta síndrome já foi relacionado

a diferentes técnicas utilizadas, dentre elas a injeção intracitoplasmática de espermatozoides e o estímulo para superovulação. Até o momento, existem sete casos de crianças com SA nascidas após TRAs, sendo que cinco destas crianças possuem problemas de *imprinting* como agente etiológico. Embora o número de casos seja pequeno, devido à raridade da doença, a proporção de crianças com defeito de *imprinting* como causa de SA (5 de 7, ou 71%) é mais alta do que na população em geral (< 5%), sugerindo uma associação entre defeitos de *imprinting* e TRA. No entanto, permanece sem resposta qual das tecnologias utilizadas (injeção de espermatozoides, fertilização *in vitro* ou indução de ovulação) é a causa deste tipo de defeito, e novos estudos são necessários.<sup>29</sup>

Em contraste com a SA, a maior parte dos casos de SWB resulta de erros de *imprinting*, e vários estudos demonstram uma prevalência aproximadamente seis vezes maior (variando de 3,2 a 16,1, dependendo do estudo) de TRA em pacientes com SWB.<sup>29,30</sup> Além disso, síndromes como Prader-Willi, Silver-Russell e diabetes transitório neonatal têm sido suspeitas de estarem relacionadas com TRAs, mas o número de casos e de publicações relacionadas ainda é muito pequeno para uma conclusão.

## Dissomia uniparental

A dissomia uniparental (UPD) é definida como a herança de ambos os homólogos de um par de cromossomos a partir de somente um genitor. Este conceito foi introduzido por Eric Engel em 1980,<sup>31</sup> por meio de considerações teóricas. Em uma revisão publicada em 2006 pelo próprio Eric Engel, o autor relembra que, trabalhando com aconselhamento genético de casais que sofriam com abortos repetidos, e percebendo com isso o quanto a não disjunção na meiose era comum, perguntou-se sobre a possibilidade de um gameta dissômico fecundar um gameta nulissômico para o mesmo par de cromossomos. Nas palavras de Engel:<sup>31</sup>

“por um longo tempo, estes pensamentos me fascinaram e tiraram o meu sono. Até que finalmente, em um sábado à noite de junho de 1979, sentei-me à mesa de jantar de minha casa para contar esta história (...). No final da noite de domingo, eu

ainda estava sentado à mesa colocando o ponto final no rascunho inicial. Meses mais tarde, devido ao processo de revisão editorial, o rascunho final foi diminuído ao ponto que a verdadeira ideia remanescente era a de que erros complementares poderiam resultar em um zigoto aparentemente normal, com um par cromossômico completamente derivado de um genitor, ou seja, o conceito de dissomia uniparental.”

Segundo o próprio autor, este artigo “permaneceu dormindo em uma prateleira” por vários anos, esperando pelos avanços moleculares que tornariam possível provar a UPD a partir de polimorfismos de DNA. Desta maneira, o primeiro caso provado de UPD foi publicado somente em 1987,<sup>32</sup> envolvendo o cromossomo 21.

Com relação aos tipos de UPD, é possível classificar um caso de dissomia de acordo com vários critérios. Primeiramente, de acordo com a origem, as UPDs podem ser paternas (UPDp), caso os dois cromossomos tenham se originado do gameta masculino, ou maternas (UPDm), se o par foi herdado do gameta feminino. Além disso, de acordo com a participação do genoma do genitor, é chamada de heterodissomia (hUPD), quando os dois cromossomos do par de um genitor estão presentes, e de isodissomia (iUPD), quando existe na prole somente um cromossomo do par, mas ele encontra-se duplicado. Finalmente, com relação à extensão do cromossomo afetado, as classes de UPD se dividem em UPD completa, dissomias de segmentos cromossômicos, além de UPDs denominadas complexas.

## Mecanismo de formação das dissomias

A formação de um gameta dissômico é ocasionada sempre pela não disjunção na meiose. Se este fenômeno ocorrer na meiose I, o gameta dissômico terá dois cromossomos homólogos, mas não idênticos, o que ocasionará uma heterodissomia. Por outro lado, se a não disjunção ocorrer na meiose II, o gameta dissômico terá o mesmo cromossomo duplicado, ocasionando, portanto, uma isodissomia.

Alguns mecanismos para a formação da UPD de cromossomos completos já foram descritos,<sup>33</sup> e incluem:

- **Resgate da trissomia:** ocorre quando um gameta com dissomia é fecundado por um gameta normal, formando um zigoto com uma trissomia. Em alguma mitose inicial, o cromossomo extra oriundo do gameta normal é expulso, originando uma célula com dois cromossomos de mesma origem, e nenhum cromossomo da origem oposta. Se este fenômeno ocorrer na primeira mitose, e o cromossomo extra for realmente expulso, ocorre o resgate completo da trissomia, originando um embrião com 100% das células com uma heterodissomia – uma vez que os cromossomos presentes do par em questão são o próprio par de homólogos do gameta envolvido. Se o cromossomo for expulso para uma das duas células originadas da primeira divisão mitótica, a consequência é uma célula trissômica e outra com uma heterodissomia, formando um organismo com trissomia em mosaico. Quanto mais tarde no desenvolvimento embrionário este fenômeno ocorrer, maior será a porcentagem de células trissômicas no organismo adulto. Outra consequência deste fenômeno somente será perceptível caso tenha ocorrido com cromossomos que possuem regiões com *imprinting* diferencial, de acordo com a origem do cromossomo, uma vez que uma dissomia causará a ausência da região ativa ou a duplicação desta região, de acordo com a origem paterna ou materna da dissomia.
- **Resgate da monossomia:** este fenômeno é causado pela união de um gameta normal e um gameta com alguma aneuploidia. O zigoto monossômico formado pode duplicar o cromossomo sem o homólogo correspondente, antes da primeira mitose, originando um par de cromossomos de mesma origem. Assim, o resgate da monossomia provocará sempre uma isodissomia, com a formação de homozigotos para mutações recessivas, caso um dos genitores seja heterozigoto, e o gameta utilizado na fecundação tenha justamente herdado o alelo mutante. Se o cromossomo envolvido possuir uma região de *imprinting* diferencial, problemas relacionados também ocorrerão de acordo com a origem.
- **Complementação gamética:** ocorre quando um gameta dissômico é fecundado por um gameta nulissômico para o mesmo par cromossômico, originando um zigoto com número normal de cromossomos, mas com dois cromossomos de mesma origem. Neste caso, a heterodissomia é mais comum, e o fenômeno relacionado ao *imprinting* já mencionado também ocorrerá, caso a UPD envolva um par cromossômico com estas características. Nos casos de complementação gamética, não é possível haver mosaico, pois 100% das células terão dissomia.
- **Erro pós-fertilização:** neste caso, os gametas que participam da fecundação são normais, e o zigoto formado possui um par de cromossomos homólogos de origens diferentes. No entanto, na primeira mitose (ou em alguma mitose inicial) ocorre a separação errada das cromátides-irmãs, e duas cromátides de um mesmo cromossomo migram para a mesma célula, enquanto a outra célula não recebe nenhuma cromátide deste cromossomo, mas somente a cromátide do cromossomo homólogo. Este erro origina uma célula com uma trissomia e outra com uma monossomia. Na próxima mitose, a célula trissômica (portadora de dois cromossomos de mesma origem e um cromossomo de outra origem) expulsa o cromossomo de origem diferente, ficando com um par de mesma origem, enquanto na célula monossômica ocorre a duplicação de seu único cromossomo, mas uma consequente não disjunção. Portanto, este fenômeno provoca a existência de uma célula com isodissomia materna, e outra com isodissomia paterna, originando um embrião em mosaico. Quando um dos genitores é heterozigoto para alguma mutação recessiva, a ocorrência de isodissomia na prole provoca a formação de homozigose para mutações recessivas. Assim, em um indivíduo com mosaicismo para dissomia, os tecidos com homozigose para estas mutações serão afetados, enquanto tecidos com dois alelos normais serão saudáveis. Com relação ao *imprinting* genômico, o mesmo fenômeno descrito anteriormente está presente, caso a dissomia tenha acontecido em um par cromossômico que possua uma região

de *imprinting* diferencial de acordo com a origem.

Além dos mecanismos discutidos anteriormente, um mecanismo peculiar de formação de UPD ocorre na presença de uma translocação robertsoniana. Na presença de uma translocação deste tipo, existe uma chance aumentada de formação de gametas dissômicos (33%), que são portadores do cromossomo translocado e também de um dos cromossomos normais. Estes gametas originariam uma prole trissômica, mas, quando o outro gameta é nulissômico para estes pares de cromossomos, ou quando ocorre o resgate da trissomia, a UPD é formada, e conta com a presença de um cromossomo normal e o outro originado da translocação.

A presença de um isocromossomo também afetará a produção de gametas, uma vez que 50% deles terão o isocromossomo e o restante será nulissômico. Gametas que portarem estes isocromossomos e forem fecundados por gametas normais originarão prole trissômica, enquanto o restante produzirá prole monossômica. Contudo, do mesmo modo que discutido anteriormente, quando o gameta produzido pelo portador do cariótipo normal é nulissômico para este cromossomo, ou quando ocorre o resgate da trissomia, a UPD é formada, com a presença de um isocromossomo.

Indivíduos portadores de ambos os tipos de aberrações terão uma chance maior de gerarem fetos inviáveis trissômicos ou monossômicos, pois os eventos discutidos (a presença de um gameta nulissômico ou o resgate da trissomia) são extremamente raros. Dois destes casos já foram apresentados na literatura: o primeiro foi o caso de uma mulher com cariótipo 45,XX,der(22;22)(q10;q10),<sup>34</sup> que teve dez abortos espontâneos antes de gerar uma filha normal. Esta filha, no entanto, foi portadora do mesmo cariótipo, e teve sete abortos espontâneos. O segundo caso, que a princípio parece improvável, demonstra a ocorrência de um isocromossomo de 13q presente em um homem.<sup>35</sup> Sua filha herdou o isocromossomo e nenhum cromossomo 13 da mãe com cariótipo normal, possuindo, portanto, uma UPD do cromossomo 13. Esta filha, com cariótipo 45,XX,i(13)(q10), teve cinco gestações interrompidas, provavelmente devido à trissomia do cromossomo 13. Contudo, na 6ª geração,

o fenômeno se repetiu, com a geração de um filho com o isocromossomo da mãe, portador de uma UPDm do 13 e nenhum cromossomo 13 do pai com cariótipo normal.

Já a UPD de um segmento cromossômico é definida como UPD de uma parte do cromossomo (telomérica ou central), em conjunto com a herança biparental do restante do par. Este tipo de dissomia tem sua origem em um evento de *crossing-over* mitótico entre duas cromátides não irmãs de dois cromossomos homólogos. Caso ocorram dois pontos de quebra, a dissomia é central, mas, com a existência de somente uma quebra, a dissomia é confinada à parte telomérica.

## Dissomias uniparentais associadas a fenótipos anormais

Uma UPD pode estar associada a uma série de fenótipos anormais, que são ocasionados por trissomia em mosaico, homozigose de mutações autossômicas recessivas e de mutações recessivas ligadas ao X em mulheres, além de expressão aberrante de genes com *imprinting* genômico dependente da origem.<sup>36</sup> O surgimento de homozigose para mutações recessivas em proles de casais com somente um genitor heterozigoto se encontra entre as consequências clínicas relevantes das UPDs. Dentre estes casos, 10% são devidos a UPD de origem materna e 23% a UPD de origem paterna.<sup>33</sup>

Outro tipo de efeito bem conhecido está relacionado à expressão alélica dependente da origem paterna ou materna, que é afetada na presença de dissomia. Este efeito está relacionado com o fenômeno de *imprinting* genômico, sendo bem conhecido especialmente para os cromossomos 6, 11 e 15, já tendo sido discutido em detalhes no início deste capítulo. No entanto, é importante lembrar que não existe nenhum problema com o padrão normal de *imprinting* nos casos de dissomia, mas as consequências clínicas são devidas ao erro na origem do cromossomo, e não devido a um erro de *imprinting* na região homóloga.

Uma série de fenótipos específicos causados pela relação entre UPD completa e *imprinting* é bem conhecida, e será discutida a seguir. Além disso, serão também apresentadas as relações de fenótipos anormais com

algumas dissomias de segmentos cromossômicos e dissomias complexas.

## Dissomias uniparentais completas

A partir dos 22 pares de autossomos e dois pares diferentes de cromossomos sexuais para cada gênero, teoricamente podem existir 47 possibilidades de UPDs: 22 autossômicas paternas, 22 autossômicas maternas, uma dissomia materna XX, e as dissomias paternas XX ou, ainda, XY. No entanto, algumas dissomias não foram identificadas até o momento, como as UPDs maternas dos cromossomos 5 e 11, as UPDs paternas dos cromossomos 4, 10, 12, 17 e 20, além da UPD para qualquer genitor dos cromossomos 18 e 19.

O motivo para a não identificação destas dissomias pode ser tanto pelo fato de elas não causarem nenhum fenótipo diferencial e, portanto, passarem despercebidas, quanto por serem, ao contrário, letais em um período muito inicial do desenvolvimento. O caso mais intrigante é a ausência de registros de UPD para o cromossomo 18, uma vez que a trissomia 18, tanto completa como em mosaico, não é tão rara. Assim, foi assumido que a UPD do cromossomo 18 é letal nas primeiras semanas de gestação.

Segundo o levantamento feito por Ogata e colaboradores,<sup>22</sup> que revisaram 266 casos de UPDs que não incluem o cromossomo 15, a grande maioria dos casos foi de origem materna, indicando uma maior taxa de não disjunção na meiose feminina. Além disso, dentre estes casos, as heterodissomias foram as mais comuns, o que reflete uma proporção maior de não disjunção na meiose I. Vários casos de UPD materna foram associados com translocações robertsonianas (18%). Por outro lado, dentre as dissomias de origem paterna, as isodissomias são mais comuns, indicando uma maior taxa de erro na meiose II.

A seguir, são apresentadas todas as 35 dissomias detectadas até o momento, com as características fenotípicas gerais, quando estiverem presentes, e também aquelas dissomias que não causam nenhuma diferença fenotípica. Estes dados foram compilados a partir de Engel,<sup>37</sup> Schinzel<sup>38</sup> e Ogata e colaboradores,<sup>22</sup> que são fontes que podem ser utilizadas para uma pesquisa mais aprofun-

dada sobre a sintomatologia de cada classe de UPD.

### 1. *Dissomia uniparental paterna do cromossomo 1*

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos. Desordens já relacionadas a este tipo de UPD e associadas a este fenômeno incluem: picnodisostose, anidrose e insensibilidade congênita à dor, deficiência de receptor de piruvato-quinase, amaurose congênita de Leber, retinite de Usher tipo II e mosaicismo para fator Rh.

### 2. *Dissomia uniparental materna do cromossomo 1*

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos. Exemplos incluem: diabetes melito tipo 1, epidermólise bolhosa junctional de Herlitz, síndrome de Chediak-Higashi, doença de Mapple Syrup tipo II e anomalia múltipla congênita.

### 3. *Dissomia uniparental paterna do cromossomo 2*

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos, como pseudo-hermafroditismo, síndrome de Crigler-Najjar tipo I e retinite pigmentosa.

### 4. *Dissomia uniparental materna do cromossomo 2*

Embora esta classe de UPD já tenha sido encontrada em dois indivíduos normais, existem ao menos outros quatro casos com fenótipos associados que incluem retardo no crescimento pré-natal, com presença de oligo-hidrâmnios, microcefalia com início pós-natal, hipotireoidismo, hérnia de hiato, estenose pilórica, anomalias de coração, pulmões e rins, dentre outros. Além disso, o surgimento de homozigose já levou ao aparecimento de acidose láctica (deficiência proteica trifuncional).

### 5. *Dissomia uniparental materna do cromossomo 3*

Um único caso comprovado de iUPD foi detectado até o momento, estando

associado à síndrome de Fanconi-Bickel, provavelmente causada pela surgimento de homozigose.

**6. Dissomia uniparental materna do cromossomo 4**

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos. Desordens já relacionadas a este tipo de UPD e associadas a este fenômeno incluem A-betalipoproteinemia e afibrinogenemia.

**7. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 5**

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos como, por exemplo, a atrofia espinhal-muscular do tipo III.

**8. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 6**

A isodissomia do cromossomo 6 é o exemplo mais frequentemente registrado de UPD de origem paterna. Enquanto praticamente todos os casos são caracterizados principalmente por DNT, a UPD é a causa de 20% dos casos desta síndrome.<sup>37</sup> Outras características de portadores desta classe de dissomia incluem macroglossia e retardo de crescimento intrauterino. Conforme discutido anteriormente neste capítulo, a DNT é considerada uma consequência do *imprinting* irregular de um ou mais genes presentes em 6q24, resultando em uma expressão aumentada de genes de origem paterna. Desta maneira, a testagem para UPD paterna do cromossomo 6 em todos os recém-nascidos com DNT é indicada.<sup>33</sup>

Além desta síndrome, a redução à homozigose já foi associada a deficiência de complemento C4A+C4B, acidemia metilmalônica e deficiência de 21-hidroxilase.

**9. Dissomia uniparental materna do cromossomo 6**

Somente dois casos de UPD de origem materna foram descritos para este cromossomo.<sup>33</sup> Enquanto um deles foi assintomático, o outro apresentou hiperplasia adrenal congênita, retardo de crescimento

intrauterino e atraso no desenvolvimento, provavelmente devido à redução à homozigose.

**10. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 7**

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose em alguns distúrbios monogênicos recessivos, como fibrose cística, síndrome de Kartagener e diarreia congênita.

**11. Dissomia uniparental materna do cromossomo 7**

A UPD de origem materna do cromossomo 7 é a segunda UPD mais frequente, perdendo somente para a UPD do cromossomo 15. Alguns pacientes portadores desta dissomia já foram relatados como possuindo fibrose cística e osteogênese imperfeita. No entanto, o aparecimento destes fenótipos não possui relação alguma com o padrão de *imprinting*, mas sim com a formação de uma prole homozigota a partir de um casal no qual somente um genitor é portador da mutação, fenômeno já discutido. Um fenótipo característico de portadores de UPD do cromossomo 7 de origem materna é a SSR, já discutida anteriormente, mas esta UPD é a causa de no máximo 10% dos casos desta síndrome.<sup>33</sup>

**12. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 8**

Até o momento, foi registrado somente um caso de iUPD nesta classe, portador de quilomicronemia familiar, devido à redução à homozigose.

**13. Dissomia uniparental materna do cromossomo 8**

Até o momento, foi registrado somente um caso de iUPD nesta classe, portador de um carcinoma ileal de início precoce, de causa desconhecida.

**14. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 9**

Somente dois casos de UPD do cromossomo 9 foram registrados na literatura, um sendo uma heterodissomia e o outro uma isodissomia. No primeiro, houve a presença de retardo de crescimento e hipotonia. Já o feto portador de iUPD teve morte no período pré-natal. A etiologia de ambos os

fenótipos não foi esclarecida até o momento.

**15. Dissomia uniparental materna do cromossomo 9**

Os nove casos de UPD materna do cromossomo 9 descritos até o momento possuem fenótipos diversos que não parecem ter relação com o fenômeno. O surgimento de homozigose foi registrado neste tipo de UPD, estando associado a hipoplasia de cabelo e cartilagem e síndrome de Leigh.

**16. Dissomia uniparental materna do cromossomo 10**

O único dado existente para este tipo de dissomia foi publicado somente em um resumo em 1992, em uma criança com uma série de sintomas que não se sabe se estavam relacionados à dissomia, e novas investigações não foram realizadas.

**17. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 11**

Uma vez que na região 11p15 estão localizados genes com metilação diferencial, a UPD afetará os fenótipos relacionados. Um destes *clusters* é regulado pela região RCI-1 (metilada no alelo paterno), enquanto o outro é regulado pela região RCI-2 (metilada no alelo materno). Uma vez que alguns destes genes são cruciais para o controle do crescimento fetal, a dissomia trará consequências marcantes que incluem desenvolvimento pré-natal inferior ao normal, ocasionando baixo peso e tamanho ao nascer, dentre várias outras características discutidas anteriormente. Estas características estão presentes na SWB, que possui até 30% dos casos originados pela UPD paterna do cromossomo 11.<sup>37</sup> Além dessa síndrome, a redução à homozigose já foi associada à presença de  $\beta$ -talassemia maior.

**18. Dissomia uniparental materna do cromossomo 12**

Somente um caso deste tipo de UPD foi registrado até o momento, em um recém-nascido saudável.

**19. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 13**

Todos os casos registrados até o momento foram normais.

**20. Dissomia uniparental materna do cromossomo 13**

Sem fenótipo associado, a não ser pelo surgimento de homozigose para a mutação 35delG no gene GJB2, o que levou à diminuição auditiva pré-lingual, sem nenhuma outra anomalia associada.

**21. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 14**

Esta classe de UPD possui um fenótipo característico, que inclui tórax diminuído em formato de sino, defeitos da parede abdominal, poli-hidrânio, placentomegalia, atraso no desenvolvimento e face característica da síndrome. Essas características são relacionadas ao aumento da expressão do gene RTL1, que se encontra ativo somente no cromossomo paterno e, portanto, a dosagem de um gene ativo está duplicada nesta classe de UPD.

**22. Dissomia uniparental materna do cromossomo 14**

Uma vez que o gene RTL1 (além do gene DLK1) está ativo somente no cromossomo paterno, como já descrito, esta classe de UPD provocará a ausência de sua expressão. Este problema está relacionado com um fenótipo que inclui baixo peso ao nascer, baixa estatura, puberdade de início precoce, obesidade, mãos pequenas, hipotonia, atraso no desenvolvimento e face característica. Além dessa síndrome, a redução à homozigose já foi associada à presença de acromatopsia congênita completa.

**23. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 15**

Conforme demonstrado anteriormente (Figura 11.1), a transcrição dos genes da região 15q11-q13 é regulada por uma região no primeiro deles, denominado SNRPN, que sofre metilação somente no cromossomo materno, impedindo a transcrição destes genes a partir deste cromossomo. Por outro lado, por não haver transcrição nesta primeira parte do *cluster*, um RNA antissenso para um dos últimos genes do *cluster* (UBE3A) não é produzido. Então, neste cromossomo (materno), este gene é expresso. Assim, em pacientes com UPD paterna do cromossomo 15, existe o



aumento da expressão dos genes relacionados ao SNRPN e a ausência de expressão do gene UBE3A, o que caracteriza 5% dos casos de SA, já discutida na primeira parte deste capítulo.

**24. Dissomia uniparental materna do cromossomo 15**

Na mesma região 15q11-q13, o gene SNRPN sofre metilação somente no cromossomo materno, impedindo a transcrição dos genes subsequentes neste cromossomo. Assim, em casos de ausência desta região do cromossomo paterno, todos os genes regulados pelo SNRPN estarão inativados, provocando a SPW. Dentre as causas para a diminuição de expressão de genes desta região, está a UPD materna do cromossomo 15 em 20% dos casos, pois a duplicação do cromossomo materno na ausência do paterno não supre a expressão dos genes da região em questão. Além dessa síndrome, a redução à homozigose já foi associada à presença de síndrome de Bloom.

**25. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 16**

Um recém-nascido com esta classe de UPD já foi registrado, e as características associadas foram retardo de crescimento intrauterino, pés calcâneos bilaterais e arco de mandíbula rudimentar. Além deste caso, um feto foi diagnosticado como sendo portador de  $\alpha$ -talassemia, causada pela redução à homozigose.

**26. Dissomia uniparental materna do cromossomo 16**

Os fenótipos associados a esta classe de UPD são extremamente variáveis. O primeiro caso diagnosticado se tratou de uma paciente absolutamente normal, mas, depois disto, uma série de outros casos foi registrada, cada um deles portando algumas características que incluíam abortos espontâneos, retardo do crescimento, retardo mental e malformações cardíacas.

**27. Dissomia uniparental materna do cromossomo 17**

Somente um caso foi descrito até o momento, com nenhum efeito fenotípico associado.

**28. Dissomia uniparental materna do cromossomo 20**

Diferentes casos de dissomia desta classe foram detectados, sem a atribuição de um fenótipo específico. Alguns autores especularam o papel do gene GNAS sobre estes fenótipos, uma vez que problemas genéticos e epigenéticos neste *locus* estão relacionados com pseudo-hipoparatiroidismo e osteodistrofia hereditária de Albright, como discutido anteriormente neste capítulo. Contudo, até o momento nenhuma das características típicas destes distúrbios foram encontradas nos casos de UPD materna do cromossomo 20.

**29. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 21**

Uma grande variação de fenótipos já foi detectada em portadores desta classe de UPD, desde a presença em fetos abortados espontaneamente, passando por um paciente com uma série de malformações e severo retardo psicomotor, e até mesmo a presença desta UPD em pessoas saudáveis.

**30. Dissomia uniparental materna do cromossomo 21**

A UPD para este cromossomo foi a primeira a ser identificada, e a portadora se tratava de uma mulher saudável que foi testada por ter dado à luz a um bebê com trissomia 21. Desde então, outros cinco casos foram registrados, a maior parte demonstrando um fenótipo normal, com exceção de um menino que desenvolveu retardo psicomotor e convulsões frequentes.

**31. Dissomia uniparental paterna do cromossomo 22**

Dois casos foram registrados até o momento, com nenhum fenótipo anormal determinado.

**32. Dissomia uniparental materna do cromossomo 22**

Todos os casos registrados desta classe de UPD até o momento ocorreram como mosaïcismo, ou na placenta ou no feto. Em casos onde somente a UPDm do 22 foi detectada, os fenótipos foram normais. A maior parte dos casos está presente em pacientes com trissomia do cromossomo 22, em graus variáveis de mosaïcismo, o

que dificulta a interpretação do papel da dissomia em si.

**33. Isodissomia uniparental paterna do cromossomo X**

Uma paciente com cariótipo normal foi descrita como portadora deste tipo de UPD, e também de algumas características de síndrome de Turner. Uma vez que aos 11 anos de idade a paciente possuía mosaïcismo 45,X/46,XX, com um pequeno número de células 45,X, e estas estavam ausentes aos 13 anos, é possível que as características tenham sido causadas tanto pelo mosaïcismo quanto pela UPD. Um segundo caso de iUPD paterna do X em uma menina foi descrito, e ela apresentou retardo mental, baixa estatura e hipotonia muscular. Além disso, existem alguns registros de iUPD, porém com cromossomos X aberrantes e, portanto, não é possível associar os fenótipos à presença exclusivamente de UPD.

**34. Dissomia uniparental materna do cromossomo X**

Em indivíduos com número normal de cromossomos X, o único fenótipo anormal já detectado foi devido à redução à homozigose, causando distrofia muscular de Duchenne. Já em mulheres com números anormais de cromossomos X, diferentes casos de heterodissomias foram descritos em mulheres 48,XXXX e 49,XXXXX, e nenhuma característica adicional foi detectada nestas síndromes.

**35. Heterodissomia uniparental paterna dos cromossomos X e Y**

Foi descrito um paciente do sexo masculino com cariótipo normal e ausência de fenótipo relacionado, a não ser pela presença de hemofilia A, herdada do pai.

mossmos do par possua origem biparental, e o cariótipo seja normal. O número teórico possível deste tipo de dissomia é infinito e, até 2008, 30 tipos de UPD de um segmento cromossômico já haviam sido identificados em vários cromossomos, sendo 21 casos de dissomia materna (a maioria isodissomias) e 5 casos de dissomia paterna. Destes cariótipos, vários foram associados com a presença de doenças (como fibrose cística e deficiência de esteroide 21-hidroxilase), mas outros não puderam ser relacionados com nenhum fenótipo anormal. Na **Tabela 11.1**, estão listados casos já relacionados a fenótipos anormais, revisados a partir de Engel,<sup>37-39</sup> Schinzel<sup>38</sup> e Kotzot.<sup>36</sup> Além destes, outras UPDs de um segmento cromossômico já foram relatadas para os cromossomos 2, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 17, 20 e X, mas sem nenhuma alteração fenotípica.

***Dissomias uniparentais complexas: um cromossomo inteiro associado a uma translocação simples ou robertsoniana de dois cromossomos não homólogos acrocêntricos***

Até 2008, um total de 38 dissomias haviam sido descritas nesta classe. Neste grupo, os casos mais comuns foram aqueles associados à translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14, especialmente como heterodissomia do cromossomo 14, de origem materna. Na verdade, a maioria dos casos com fenótipo de UPD do cromossomo 14 foi descoberta por causa da translocação robertsoniana, frequentemente entre dois cromossomos 14.

Neste grupo de dissomias complexas, encontram-se seis casos com SPW/SA: do primeiro grupo constam três pacientes com translocações entre os cromossomos 14 e 15 e dois pacientes com o mesmo tipo de aberração entre os cromossomos 13 e 15. Como estas translocações causaram sempre uma dissomia do cromossomo 15 de origem materna, o fenótipo relacionado foi a SPW. Por outro lado, o segundo grupo conta com um único caso de translocação robertsoniana entre os cromossomos 14 e 15, em um paciente com SA, pois a origem da dissomia foi paterna.

**Dissomias uniparentais de um segmento cromossômico e dissomias uniparentais complexas**

***Dissomias uniparentais de um segmento cromossômico***

Esta classe de dissomias ocorre quando somente uma região cromossômica possui a mesma origem, embora o restante dos cro-

*Dissomias uniparentais complexas: UPD de um cromossomo inteiro associada a um isocromossomo definido citogeneticamente*

Este tipo de dissomia, envolvendo uma quantidade normal de material genético, é possível se:

- um isocromossomo substitui os dois homólogos de um par de cromossomos acrocêntricos, ou
- há presença de dois isocromossomos tanto para os braços longos quanto para os curtos de um cromossomo não acrocêntrico.

Até o momento, 45 pacientes já foram detectados como sendo portadores deste tipo de dissomia complexa, a maioria tendo origem materna. Dentre os 29 casos com origem

**TABELA 11.1**  
Relação entre UPD de segmentos cromossômicos e fenótipos alterados

Cromossomo	Origem	Região	Fenótipo
1	materna	p11.2qter	progeria do tipo Hutchinson-Gilford
	materna	q22qter	progeria do tipo Hutchinson-Gilford
	paterna	q22qter	progeria do tipo Hutchinson-Gilford
	materna	p31	amaurose de Leber
	materna	p22.1	doença de Stargardt
2	materna	q37.3	hiperoxalúria tipo 1
	materna	p12p11.2	hipotireoidismo congênito
3	materna	q21.3qter	granulomatose crônica
4	materna	q21q35	abetalipoproteinemia
	materna	p13p16	síndrome de Ellis van Creveld
	?	p	diabete melito, diabete insípido, atrofia ótica e surdez (DIDMOAD)
5	materna	q32	síndrome de Netherton
6	paterna	p21.3	deficiência de esteroide 21-hidroxilase
	paterna	q24qter	diabete melito neonatal transitório
7	materna	q31qter	síndrome de Silver-Russel
	materna	q21qter	fibrose cística
	materna	q	fibrose cística
11	materna	q13qter*	vários distúrbios e baixa estatura
	paterna	p15.5	até 20% dos casos de pacientes com síndrome de Wiedemann-Beckwith (portadores em mosaico)
	paterna	p13pter	síndrome de Wiedemann-Beckwith (portador em mosaico)
14	materna	q23q24.2	síndrome de UPDm do cromossomo 14
	materna	q12q24.3	síndrome de UPDm do cromossomo 14
	paterna	q12qter	síndrome de UPDp do cromossomo 14
15	materna	q proximal	síndrome de Prader-Willy
20	paterna	q	resistência ao PTH

\* Com trissomia parcial.

materna, 12 se tratavam de isocromossomos de 14q, enquanto que, dentre os 19 casos de origem paterna, os mais comuns envolveram isocromossomos de 13q, 14q e 15q.

Outros exemplos incluem UPD materna do cromossomo 2, com dois isocromossomos (2p e 2q); UPD materna do cromossomo 9, com dois isocromossomos (9q e 9p); e UPD do cromossomo 7, com um isocromossomo 7q materno e um isocromossomo 7p paterno.

### *Dissomias uniparentais complexas: UPD de um cromossomo inteiro associada a um marcador supranumerário ou cromossomo em anel*

Esta classe de dissomias contém 33 casos descritos, sendo que 28 deles eram de origem materna. Destaca-se a presença de 19 casos envolvendo o cromossomo 15, com fenótipos variáveis de acordo com a parte do cromossomo envolvida. Exemplos são os cariótipos 47,XY,r(15)/46,XX e 47,XY,+idic(15)/46,XY.

Um fato muito comum neste grupo é a presença de UPD em mosaico, como acontece com todos os casos do cromossomo 15. Outros exemplos de cromossomos em anel associados à UPD são os cariótipos 47,XX,+r(6)/46,XX e 47,XX,r(9)/46,XX.

Uma vez que o número possível de dissomias complexas é infinito, a detecção de muitos novos casos ocorrerá no futuro. Além disso, é possível que ainda sejam detectadas dissomias completas para aqueles cromossomos que ainda não estiveram presentes em cópias uniparentais em pacientes com fenótipos alterados, pois a detecção destas dissomias que não causam nenhum efeito se deve puramente ao acaso.

A UPD permanece, assim, como uma fascinante peculiaridade da segregação cromossômica em humanos. Além disso, a UPD é um exemplo da plasticidade do genoma humano, que pode tolerar a perda da herança biparental para a maioria dos cromossomos, ao contrário do que acontece para uma minoria de pares cromossômicos contendo genes com expressão diferencial de acordo com a origem.

## Referências

- McGrath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science*. 1984 Dec 14;226(4680):1317-9.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 1984 Apr 5-11;308(5959):548-50.
- Cattanach BM, Kirk M. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*. 1985 Jun 6-12;315(6019):496-8.
- Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C.H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Dec;981:61-81.
- Feinberg A. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):433-40.
- Rossignol S, Netchine I, Le Bouc Y, Gicquel C. Epigenetics in Silver-Russell syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jun;22(3):403-14.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):597-610.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986 May 15-21;321(6067):209-13.
- Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Epigenetics*. 2008 Jan-Feb;3(1):5-13.
- Catalogue of Parent of Origin Effects [Internet]. Dunedin, NZ: University of Otago; c2010. [capturado em 2010 Jul 12]. Disponível em: <http://igc.otago.ac.nz/home.html>
- Davies W, Lynn PM, Relkovic D, Wilkinson LS. Imprinted genes and neuroendocrine function. *Front Neuroendocrinol*. 2008 Jun;29(3):413-27.
- Brandeis M, Kafri T, Ariel M, Chaillet JR, McCarrey J, Razin A, et al. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J*. 1993 Sep;12(9):3669-77.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 15;13(8):839-49.
- Hurst LD. Peromysci, promiscuity and imprinting. *Nat Genet*. 1998 Dec;20(4):315-6.
- Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific

- fic gene expression. *Nat Rev Genet.* 2003 May;4(5):359-68.
16. Hurst LD, McVean GT. Growth effects of uniparental disomies and the conflict theory of genomic imprinting. *Trends Genet.* 1997 Nov;13(11):436-43.
  17. Lalonde M, Calciano MA. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Apr;64(7-8):947-60.
  18. Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A.* 2008 Aug 15;146A(16):2041-52.
  19. Eggermann T, Eggermann K, Schönherr N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russel syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet.* 2008 Apr;24(4):195-204
  20. Temple IK. Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr Dev.* 2007;12:113-23.
  21. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004 Dec;145(12):5459-64.
  22. Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics.* 2008 Jul-Aug;3(4):181-7.
  23. Zaitseva I, Zaitsev S, Alenina N, Bader M, Kriovkharchenko A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007 Oct;74(10):1255-61.
  24. Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.* 2000 Jun;62(6):1526-35.
  25. Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoche MA, Dandolo L, Vaiman D, et al. Assisted reproductive technology affects development kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol.* 2007 Oct 18;7:116.
  26. Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet.* 2008 Jan 1;17(1):1-14.
  27. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet.* 2004 May 22;363(9422):1700-2
  28. Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet.* 2002 Jul;71(1):162-4.
  29. Lawrence LT, Moley KH. Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med.* 2008 Mar;26(2):143-52.
  30. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2009 Feb;91(2):305-15.
  31. Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet.* 1980;6(2):137-43.
  32. Créau-Goldberg N, Gégonne A, Delabar J, Cochet C, Cabanis MO, Stehelin D, et al. Maternal origin of a de novo balanced t(21q21q) identified by ets-2 polymorphism. *Hum Genet.* 1987 Aug;76(4):396-8.
  33. Kotzot D, Utermann G. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A.* 2005 Jul 30;136(3):287-305.
  34. Kirkels VG, Hustinx TW, Scheres JM. Habitual abortion and translocation (22q;22q): unexpected transmission from a mother to her phenotypically normal daughter. *Clin Genet.* 1980 Dec;18(6):456-61.
  35. Slater H, Shaw JH, Dawson G, Bankier A, Forrest SM. Maternal uniparental disomy of chromosome 13 in a phenotypically normal child. *J Med Genet.* 1994 Aug;31(8):644-6.
  36. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet.* 2008 Sep;45(9):545-56.
  37. Engel E. Some lessons from uniparental disomy (UPD) in the framework of contemporary cytogenetics and molecular biology. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* [Internet]. Poitiers, France: Jean-Loup Huret, Genetics DIM, University Hospital; 2003 Dec [capturado em 2010 Jun 12]. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/UniparentDisomyID20046.html>
  38. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed., rev. and expand. Berlin; New York: de Gruyter; 2003.
  39. Engel E. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet.* 2006 Nov;14(11):1158-69.

# Sítios frágeis

## Introdução

Sítios frágeis cromossômicos são *loci* específicos que apresentam instabilidade cromossômica, visualizados como quebras ou falhas nos cromossomos metafásicos após inibição parcial da síntese de DNA.

O termo sítio frágil foi sugerido em 1970 para descrever quebras cromossômicas recorrentes no braço longo do cromossomo 16, em uma família com segregação de padrão mendeliano. No final da década de 1970, foi descrito o sítio frágil na região Xq28 em famílias segregando deficiência mental ligada ao X. Foi, então, observada a necessidade de uso de meio de cultura pobre em ácido fólico para expressar este sítio frágil e outros sítios frágeis autossômicos.<sup>1</sup>

## Classificação dos sítios frágeis

Os sítios frágeis são categorizados em duas classes principais, de acordo com a frequência populacional: raros ou comuns (**Tabela 12.1**).<sup>2</sup>

Os sítios frágeis raros são observados em menos de 5% da população e em geral são causados por expansão de trinucleotídeos. Eles são subdivididos de acordo com as condições de indução utilizadas na cultura de células.

Os sítios frágeis comuns são observados em todos os indivíduos, representando um componente da estrutura cromossômica normal. A maioria dos sítios frágeis comuns é induzida por afidicolina.

## Sítios frágeis raros

O maior grupo de sítios frágeis é folato-sensível e está associado com expansão de repetições CGG. Este grupo inclui: FRAXA, no gene *FMR1*, responsável pela síndrome do X frágil; FRAXE, no gene *FMR2*, associado com retardo mental inespecífico. Os sítios frágeis raros também podem ser induzidos por bromodeoxiuridina (BrdU), como FRA10B, e tanto por BrdU ou distamicina A, como por FRA16B. Os sítios frágeis FRA10B e FRA16B são respectivamente causados por minissatélites AT de 42 e 33 pares de bases.

## Sítios frágeis comuns

Os sítios frágeis comuns são na sua maioria induzidos por afidicolina, um inibidor da DNA-polimerase. Outros sítios frágeis comuns são induzidos por BrdU ou 5-azacitidina, drogas inibidoras da metilação do DNA. Até o momento, 15 sítios frágeis comuns induzidos por afidicolina foram clonados e completamente caracterizados. Em geral, ocorrem em regiões ricas em AT, porém sem evidência de repetição de expansão. Muitos deles estão localizados dentro ou ao longo de genes conhecidos (**Tabela 12.2**).

O primeiro sítio frágil comum caracterizado, o FRA3B, foi mapeado e clonado e está localizado dentro do gene *FHIT*. Este gene tem aproximadamente 900 kb, porém com um transcrito pequeno de somente 1,1 kb, pois possui dois grandes íntrons, onde FRA3B está localizado centralmente.

Dois outros sítios frágeis comumente expressos também se encontram localizados em genes grandes. FRA16D localiza-se dentro do

gene *WWOX*, e FRA6E dentro do gene *PERK2*. Ambos os genes apresentam pequenos transcritos e possuem grandes íntrons.

Os sítios frágeis comuns são evolutivamente bem conservados em mamíferos, sendo descritos em várias espécies diferentes como primatas, gato, cachorro, porco, vaca e camundongos.<sup>3</sup>

### Dinâmica da replicação dos sítios frágeis

Sítios frágeis apresentam características de replicação tardia. Os sítios frágeis raros apresentam repetições AT e CGG, podendo formar estruturas secundárias como grampo (*hair-pin*), triplex e tetraplex que resultam na inibição da forquilha de replicação do DNA. Os sítios frágeis comuns como o FRA3B também apresentam replicação tardia, pois aproximadamente 16,5% do FRA3B permanecem não replicados em G<sub>2</sub> depois da adição de afidicolina. As regiões dos sítios frágeis iniciam a replicação no início da fase S, porém completam a replicação tardiamente, sendo as falhas e as quebras cromossômicas resultado do DNA não replicado.<sup>4</sup>

A expansão CGG e os minissatélites AT também influenciam a montagem das unidades básicas da cromatina, os nucleossomos, contribuindo para a expressão do sítio frágil.<sup>5</sup>

### Sítios frágeis e doenças

Alguns sítios frágeis têm sido relacionados com doenças na espécie humana. Vejamos, a seguir, algumas delas.

### Síndrome do X frágil

O sítio frágil FRAXA é expresso na síndrome do X frágil. Esta é a forma mais comum de deficiência mental herdada, com prevalência de 1:4.000 a 1:6.000 nascimentos. Os indivíduos apresentam características clínicas como face estreita e alongada, orelhas proeminentes e macro-orquidia, associadas a alterações de comportamento como hiperatividade, aversão ao contato ocular, maneirismos de mãos e alteração do humor.<sup>6</sup>

A repetição CGG FRAXA está localizada na região 5'UTR do gene *FMR1* (*fragile mental retardation 1*). Esta é uma região polimórfica com alelos variando entre 6 e 50 repetições CGG na população normal. Alelos com 55 a 200 repetições CGG apresentam pré-mutação. Na mutação completa (acima de 200 repetições CGG), há metilação da ilha CpG da região promotora do *FMR1*, inibindo a transcrição do produto gênico do *FMR1*, e falta da síntese da proteína FMRP. Esta proteína forma um complexo ribonucleoproteico mensageiro carregando outras proteínas e RNA ao longo dos neurônios.

TABELA 12.1  
Classificação dos sítios frágeis

Classe	Número de loci	Sequência
<b>Sítios frágeis raros</b>	<b>31</b>	
Folato-sensíveis	24	(CGG)n
Induzidos por distamicina A	5	Rica em repetição AT
Induzidos por BrdU	2	Rica em repetição AT
<b>Sítios frágeis comuns</b>	<b>87</b>	
Induzidos por afidicolina	76	Rica em AT
Induzidos por BrdU	7	Rica em AT
Induzidos por 5-azacitidina	4	Não caracterizada

Fonte: Adaptada de Durkin e Glover.<sup>2</sup>

Indivíduos com a mutação completa apresentam falta da proteína FMRP e as características clínicas descritas anteriormente. Indivíduos com a pré-mutação não apresentam deficiência mental, porém 28% das mulheres apresentam falência ovariana precoce. A pré-mutação também tem sido relacionada a síndrome de ataxia, tremor, demência e disfunção autonômica na idade adulta.

O diagnóstico da síndrome do X frágil é realizado pela detecção de expansão CGG por técnicas de biologia molecular. A análise citogenética do sítio frágil não é recomendada para diagnóstico desta síndrome, pois as técnicas de indução do sítio frágil folato-sensível FRAXA também expressam outros sítios frágeis raros e comuns presentes na mesma região cromossômica Xq27.3, como FRAXE e FRAXD, determinando erros de diagnóstico.

### Deficiência mental FRAXE

O sítio frágil FRAXE está associado com deficiência mental leve sem características fenotípicas. É uma patologia rara com prevalência de 1:100.000 a 1:150.000 na população em geral. A repetição CGG FRAXE está localizada na região 5'UTR do gene *FMR2* (*fragile mental retardation 2*). Esta é uma região polimórfica com alelos variando entre 4 e 39 repetições CGG na população normal. Indivíduos apresentando deficiência mental

FRAXE apresentam mais de 200 repetições CGG, levando a hipermetilação da ilha CpG, que determina a falta de transcrição do gene *FMR2*.<sup>5</sup>

### Síndrome de Jacobsen e FRA11B

A síndrome de Jacobsen é causada por deleção do braço longo do cromossomo 11q23, na região do *locus* FRA11B. Ela apresenta incidência de 1:100.000 e é caracterizada por deficiência mental e atraso de crescimento, associados a características faciais como microcefalia, trigonocefalia, hipertelorismo, epicanto, ptose palpebral, narinas antevertidas e micrognatia. Cinquenta por cento dos indivíduos afetados apresentam cardiopatia congênita. Alguns casos ocorrem por translocação balanceada herdada dos pais, porém, na maioria dos casos, a deleção é *de novo*, em geral no cromossomo de origem paterna.

### Sítios frágeis comuns e câncer

Vários estudos têm demonstrado que os sítios frágeis comuns são locais onde frequentemente ocorrem quebras e rearranjos em células cancerosas. Os sítios frágeis comuns mais frequentemente expressos, FRA3B e FRA16D, se localizam nas regiões intrônicas de genes supressores de tumor, os genes *FHIT* e *WWOX*, respectivamente.

**TABELA 12.2**  
Sítios frágeis comuns e genes associados

Sítio frágil	Localização cromossômica	Genes associados
FRA2G	2q31	IGRP, RDHL, LRP2 e outros
FRA3B	3p14.2	FHIT
FRA4F	4q22	GRID2
FRA6E	6q26	PARKIN, MAP3K4, LPA e outros
FRA6F	6q21	REV3L, DIF13, FKHL1 e outros
FRA7E	7q21.11	LEP
FRA7G	7q31.2	CAV.1, VAV2, TESTIN e MET
FRA9E	9q32-33.1	PAPPA, ROD1, KLF4 e outros
FRA16D	16q23.3	WWOX
FRACB	Xp22.3	STS

Fonte: Adaptada de Glover e colaboradores.<sup>3</sup>



O gene *FHIT* (tríade de histidina frágil) catalisa a hidrólise de polifosfato de diadenosina, e tem função de sinalizador celular e resposta a dano de DNA. *FHIT* frequentemente está envolvido em perda bialélica e outras anormalidades cromossômicas como deleção, transcrição anormal e perda de expressão em tumores. Em células cancerosas, a deleção mais comum envolve o éxon 5 do *FHIT*, sendo detectado em adenocarcinoma de esôfago, câncer gástrico, carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço, linfomas de células B e câncer de pulmão.<sup>5</sup>

*WWOX* codifica uma proteína de 46 kDa que contém dois domínios WW e um domínio de cadeia curta desidrogenase/reductase que tem papel fundamental na via da apoptose. A inativação espontânea de *Wwox* leva a osteossarcoma em camundongos jovens *Wwox*<sup>-/-</sup> e a carcinomas papilares de pulmão em adultos *Wwox*<sup>+/-</sup>. A deleção de marcadores de microssatélite dentro de FRA16D/*WwoX* é prevalente em vários tumores, incluindo de mama, próstata, esôfago, pulmão, estômago e carcinoma pancreático.<sup>5</sup>

## Referências

1. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*. 1977 Jul 15;197(4300):265-6.
2. Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*. 2007;41:169-92.
3. Glover TW, Arlt MF, Casper AM, Durkin SG. Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R197-205.
4. Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)*. 2006 Sep 8;5(9-10):1126-35.
5. Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet*. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R150-8.
6. Félix TM, de Pina-Neto JM. Fragile X syndrome. Clinical and cytogenetic studies. *Arq Neuropsiquiatr*. 1998 Mar;56(1):9-17.

Juan Clinton Llerena Junior  
Anna Luiza Vaz Serrão

# Síndromes de instabilidade cromossômica: anemia de Fanconi

## Introdução

As doenças de origem genética que apresentam uma instabilidade cromossômica ou um padrão específico de anomalias cromossômicas como critério diagnóstico são raras, porém muito bem documentadas. As síndromes anemia de Fanconi (AF), ataxia-telangiectasia (SAT) e Bloom (SB) representam os principais exemplos, tendo a instabilidade cromossômica denotando uma provável incapacidade na manutenção da integridade do genoma, muitas vezes descrita como decorrente de erros nos mecanismos de reparo do DNA. Na AF, a recente descoberta do supercomplexo *BRAFT* representou o último elo necessário para vinculá-la com as vias de reparo do DNA.<sup>1</sup> Na SAT, há um importante distúrbio de checagem do período de transição G<sub>1</sub>-S do ciclo celular.<sup>2</sup> Na SB, mutações no gene da família das helicases *RECQ*, responsáveis pelo sistema de reparo nas lesões da fita dupla e de supressão das recombinações ilegítimas, são implicadas.<sup>2</sup> A **Tabela 13.1** lista as doenças descritas como tendo uma instabilidade cromossômica e relacionadas a um possível erro de reparo do DNA atribuído a uma causa genética.

É bem conhecida a relação entre estas doenças e a suscetibilidade ao câncer. A localização e o tipo de câncer são variados, podendo ocorrer em idade muito precoce, como na AF. É conhecida a predileção por alguns sistemas, como o sistema linforreticular na SAT, ou o câncer ginecológico/oral na SF, ou ainda em múltiplos sítios, como nos casos da

SB. É reconhecida, também, a associação com fenótipos clínicos distintos, como defeitos do eixo radial associados ao déficit pêntero-estatural e manchas do tipo “café com leite” na AF; telangiectasias oculares associadas à ataxia na SAT, ou ainda baixa estatura com lesões faciais semelhantes ao lúpus eritematoso na SB.

Neste capítulo, a AF será revista, sendo estabelecidas diretrizes para seu reconhecimento clínico através das técnicas citogenéticas, entre outras.

## Anemia de Fanconi (OMIM 227650\*)

A AF é uma doença de caráter genético com uma herança autossômica recessiva (13 grupos de complementação), exceto para o grupo B (ligado ao cromossomo X – OMIM 300514), que geralmente pode ser identificada a partir de dois referenciais clínicos:

1. presença de anomalias físicas constitucionais, entre as quais se destacam pigmentação cutânea anômala (manchas do tipo “café com leite” – 58,4%), déficit pêntero-estatural (60,9%), anomalias estruturais do eixo radial (51%), microcefalia (37%) e microftalmia (38,1%) (**Tabela 13.2**);

\* N. de R.T. OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*. Catálogo das Heranças Mendelianas Humanas.

2. invariavelmente associada a uma pancitopenia progressiva com eventual progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) ou outras neoplasias (**Tabela 13.3**).

Cerca de 25% dos casos de AF não apresentam defeitos congênitos. A instalação da sintomatologia hematológica frequentemente ocorre na primeira década de vida e, excepcionalmente, no primeiro ano de vida. A falência da medula óssea envolve as três linhagens (sé-

rie vermelha, megacariócitos e série branca) e tende a progredir para uma pancitopenia medular com uma medula óssea escassa de células e ocupada por fibrose e tecido gorduroso.<sup>5</sup> Na experiência pessoal dos autores em 49 casos de AF, o diagnóstico citogenético de certeza nos casos investigados devido a malformação congênita ocorreu em média aos 21 meses de idade (17 dias a 2 anos e 8 meses) (**Figura 13.1**), enquanto entre os indivíduos encaminhados devido ao distúrbio hematoló-

**TABELA 13.1**  
Síndromes com instabilidade cromossômica constitucional ou erros de reparo do DNA de causa genética

Síndrome	Mecanismo(s) etiológico(s) provável(is)
Síndrome de Bloom <sup>a,b</sup> – MIM 210900	Mutações na helicase RECQ2; distúrbio no reparo de danos tipo fita dupla e supressão de recombinações ilegítimas.
Síndrome ataxia-telangiectasia clássica <sup>a</sup> (SAT) – MIM 251260	Inibição de transdução e sinalização da checagem G1-S no ciclo celular.
Anemia de Fanconi <sup>a</sup> – MIM 227650	Mutações na via BRAFT de reparo do DNA.
Síndrome de Werner <sup>b</sup> – MIM 604611	Mutações na helicase RECQ3; distúrbio no reparo de danos tipo fita dupla e supressão de recombinações ilegítimas.
Síndrome de Rothmund-Thomson <sup>b</sup> – MIM 268400	Mutações da helicase RECQL4; distúrbio no reparo de danos tipo fita dupla e supressão de recombinações ilegítimas.
Síndrome de Nijmegen <sup>c</sup> (variante 01 AT) – MIM 251260	Mutação no gene NBS1.
Síndrome de Berlin (variante 02 AT) – MIM 251260	Desconhecido.
Síndrome ICF <sup>c</sup> – MIM 242860	Distúrbio global da metilação; satélites clássicos II e III.
Xeroderma pigmentosum <sup>d</sup> – MIM 278700	Defeito de reparo do tipo excisão dos dímeros de pirimidinas induzidas por UV.
Síndromes com instabilidade cromossômica de caráter familiar descritas de forma isolada <sup>4e</sup>	Desconhecido.
Progeria <sup>f</sup>	Desconhecido.
Disqueratose congênita <sup>f</sup>	Disfunção das telomerasas com perda da manutenção dos telômeros.
Incontinentia pigmenti <sup>f</sup>	Mutações do gene NEMO.
Síndrome dos nevos e carcinoma basocelular (síndrome de Gorlin – MIM 109400)	Mutações no gene PTCH.

<sup>a</sup> Instabilidade cromossômica clássica; <sup>b</sup> Mutações nas helicases RECQ; <sup>c</sup> Instabilidade genômica ou de metilação genômica; <sup>d</sup> Ausência de instabilidade cromossômica; <sup>e</sup> Instabilidade cromossômica em famílias isoladas; <sup>f</sup> Instabilidade cromossômica casual.

**TABELA 13.2**  
Defeitos congênitos em pacientes com anemia de Fanconi

Anormalidade	Idade ao diagnóstico		
	Todos os casos	≤ 1 ano	≥ 16 anos
Número de casos	1.206	43 (4%)	104 (9%)
Manchas do tipo "café com leite"	55%	37%	61%
Baixa estatura	51%	47%	57%
Membros superiores	43%	63%	39%
Cabeça	26%	37%	18%
Olhos	23%	33%	24%
Renal	21%	42%	19%
Distúrbios neurológicos	11%	5%	8%
Orelhas, audição	9%	23%	11%
Membros inferiores	8%	16%	7%
Cardiopulmonar	6%	16%	5%
Gastrointestinal	5%	28%	6%
Sem anomalias	25%	16%	23%
Baixa estatura e/ou pele	11%	5%	19%

Fonte: Adaptada de Owen e colaboradores.<sup>6</sup>

gico, ocorreu aos 8 anos e 5 meses de idade (2 anos a 20 anos) (RAFIFF/RJ).<sup>8</sup> Nessas situações, a revisão clínica dos casos afetados revelou quase que universalmente a presença de déficit pôndero-estatural, manchas do tipo “café com leite”, além de alterações do eixo radial variando com uma hipoplasia discreta em um dos polegares associada a hipoplasia da região tenar (Figura 13.1).

A AF já foi descrita em todas as etnias e se aceita uma frequência de 1:350.000 nascimentos. Contudo, frequências de 1:20.000 nascimentos já foram relatadas para determinados grupos étnicos (p. ex., africaners), atribuídas a um efeito genético fundador.<sup>3</sup> É bastante provável que tal incidência esteja subestimada, pois além de 25% dos casos de AF não apresentarem malformações congênitas (Tabela 13.1),<sup>9</sup> pacientes com anemia aplásica considerada de causa idiopática (causa desco-

nhecida – AAI) não são regularmente investigados para AF pelo DEB-teste. Na experiência dos autores, o estudo citogenético em 248 casos de AAI testados pelo DEB-teste identificou 36 casos (14,5%) anteriormente não diagnosticados como AF. Portanto, estas frequências relatadas para AF devem ser interpretadas com cautela. O **Quadro 13.1** mostra o protocolo de aplicação do teste citogenético.

As células de pacientes com AF são caracterizadas por um aumento espontâneo de quebras cromossômicas.<sup>10</sup> Entretanto, o diagnóstico de AF não se baseia apenas na presença de quebras cromossômicas espontâneas, pois em cerca de 50% dos casos não se identifica uma instabilidade espontânea em culturas de linfócitos. A característica celular patognomônica da AF é a incapacidade das células de reparar danos cromossômicos induzidos por drogas polifuncionais elastogênicas, produzindo pontes entre os filamentos do DNA.<sup>11</sup> As principais drogas utilizadas no teste diagnóstico da AF são o diepoxibutano (DEB) e a mitomicina C (MMC), entre outras, em culturas de linfócitos periféricos.<sup>12</sup> O resultado da exposição das

\* N. de R.T. RAFIFF/RJ – Registro de Anemia de Fanconi do Instituto Fernandes Figueira (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

células de AF aos agentes alquilantes resulta em um excesso de quebras e rearranjos cromossômicos quando comparado aos controles normais. Entre as anomalias cromossômicas, observam-se quebras, fragmentos, rearranjos específicos (trirrádio, quadrirrádio, trocas intercromátides) e rearranjos complexos (**Figura 13.2**).<sup>10,13</sup> Entre 124 casos investigados devido a malformações congênitas no Departamento de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ (RJ), 8,06% foram positivos para AF, e 50% dos casos encaminhados tanto pelo quadro hematológico como por malformação congênita foram positivos para AF. Deve-se ressaltar a importância da investigação citogenética pelo DEB-teste em possíveis doadores de medula óssea. A **Figura 13.3** mostra o algoritmo diagnóstico na AF.

### Outros métodos diagnósticos para a anemia de Fanconi

A citometria de fluxo avalia a cinética do ciclo celular e, nos casos de AF, uma proporção maior de células concentradas na fase G<sub>2</sub>/M após exposição aos agentes clastogênicos sugere o diagnóstico. Ao contrário do número limitado de células analisadas pelo método citogenético tradicional, a citometria de fluxo permite a análise de milhares de células utilizando um método menos laborioso e mais subjetivo. Contudo, é necessária uma instrumentação mais sofisticada. Este teste é realizado em laboratórios especializados e não está disponível de forma ampla no estudo das instabilidades cromossômicas nos laboratórios

de análise clínica. Tal sistema poderá dar um resultado falso-negativo em pacientes com síndrome mielodisplásica ou LMA.

A análise de complementação gênica na AF pode ser obtida utilizando linfócitos, células linfoblastoides transformadas ou fibroblastos cultivados com células ou retrovírus transfectados de células do paciente com conhecidos genes do complexo FANC. Este tipo de teste ainda não está disponível para uso clínico, estando limitado à disponibilidade de células ou DNA clonados para genótipos conhecidos da AF e restrito a poucos laboratórios de pesquisa. Atualmente, existem 13 genes envolvidos na AF caracterizando, portanto, 13 grupos de complementação gênica.

A análise molecular implica em determinar a presença de uma mutação específica em um dos múltiplos genes associados na AF. Ela requer uma sofisticada metodologia laboratorial molecular. Na maioria dos laboratórios, isso depende da determinação do complemento gênico para direcionar a investigação molecular diante da grande variedade de mutações e de genes na AF. O estudo molecular é utilizado para confirmar casos de AF quando o grupo de complementação é conhecido, assim como em estudos familiares para determinar indivíduos afetados ou heterozigotos. Esta informação molecular tem sido amplamente utilizada para a recente metodologia de diagnóstico pré-implantação pré-natal em célula única de famílias em risco para AF. Nestas circunstâncias, a investigação concomitante do complexo HLA permite selecionar embriões sem AF e possíveis candidatos a doadores de medula óssea pós-natal.

**TABELA 13.3**  
Tipos de câncer na anemia de Fanconi

Tipo	Masculino	Feminino	Total
Cabeça e pescoço	9	12	21
Gastrointestinal	3	7	10
Ginecológico	0	16	16
Cérebro	1	3	4
Outros	1	8	9
Total	14	46	60

Fonte: Adaptada de Alter.<sup>7</sup>

O estudo do produto gênico D2 por *Western Blot* consiste em identificar o produto proteico do gene D2, tanto em sua forma mais longa (D2 ubiquitinado – D2-L) como em sua forma mais curta (D2 não ubiquitinado – D2-C). Seguindo algum dano no DNA, o produto de pelo menos cinco genes da AF (grupos de complementação A, C, E, F, G) e outros cinco produtos (ligases) formam um complexo proteico sinalizando e direcionando a monoubiquitinação da proteína D2 para a cofocalização nuclear ao produto proteico BRCA1. Nos casos de AF, basta que um dos produtos deste complexo esteja ausente para que o complexo proteico não se forme e, em consequência, esta cadeia de eventos não seja acionada. Desta forma, somente a cadeia curta de D2 é visualizada no *Western Blot* nos casos de AF cuja alteração genética envolva os

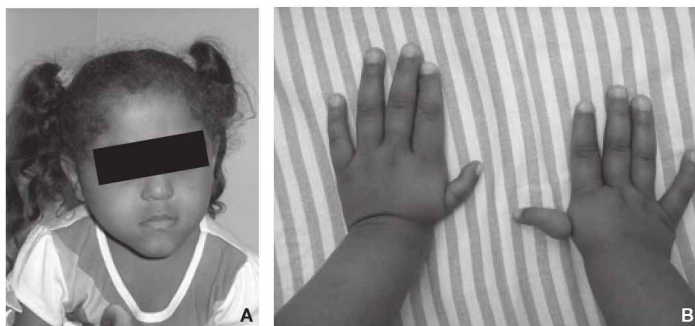
genes relacionados a este complexo proteico (**Figura 13.4**).<sup>1</sup>

A cultura de fibroblastos é útil para os casos de pacientes que tenham eventualmente mosaicismos somáticos hematopoiético, ou para casos de diagnóstico pré-natal para casais em risco, utilizando células provenientes da vilosidade corial ou do líquido amniótico.

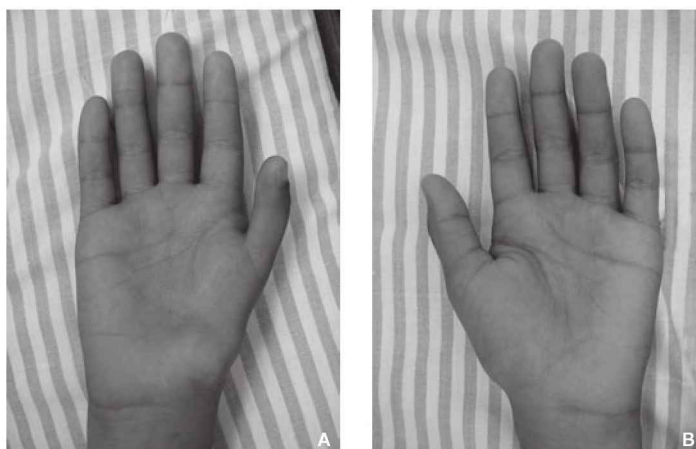
Muitos pacientes com hipoplasia/aplasia medular apresentam uma baixa população de linfócitos periféricos, além de geralmente terem sido submetidos a múltiplas transfusões sanguíneas, o que pode tornar a análise cromossômica difícil. Nestas circunstâncias, o estudo citogenético poderá ser realizado em culturas de longa duração, a partir de explantes de pele (fibroblastos), para o diagnóstico da instabilidade cromossômica DEB-induzida.<sup>12</sup>

**Figura 13.1**

**Paciente 1:** (a) típica face de paciente com anemia de Fanconi, sendo observada a hiperromia periorbitária; (b) típico defeito do eixo radial mostrando malformação congênita de ambos os polegares. **Paciente 2:** paciente com anemia de Fanconi encaminhado devido a AAI, examinado após o diagnóstico citogenético ter sido estabelecido. Observar hipoplasia da região tenar e do polegar em comparação à mão contralateral previamente não observada.



Paciente 1



Paciente 2



Os estudos hematológicos na AF apontam que 98% dos casos poderão desenvolver distúrbios hematológicos até os 40 anos de idade, tendo a aplasia de medula óssea como a complicação mais grave e frequentemente fatal.<sup>5</sup> É comum também a presença de uma síndrome mielodisplásica ou LMA. Nos quadros de mielodisplasia, é frequente a associação com clones celulares em preparados de medula óssea, preferencialmente envolvendo o cromossomo 7. A LMA, ao contrário da leucemia linfocítica aguda comum da infância, é a complicação hemato-oncológica na AF mais frequentemente descrita.

É importante ressaltar a necessidade do estudo citogenético em anemia aplásica (AA)

dita idiopática, especialmente para os casos encaminhados ao transplante de medula óssea, além de seus doadores.<sup>14</sup> A AA na AF tem merecido especial atenção com relação aos transplantes de medula óssea, pois novos protocolos de condicionamento diferenciaram reduziram consideravelmente a morbimortalidade associada com as complicações pós-transplante.<sup>6</sup> Entre os casos de AF com doadores relacionados, uma combinação de protocolos tem sido utilizada com grande sucesso, sendo um deles na experiência do grupo brasileiro de Curitiba,<sup>15</sup> na qual são relatados os resultados de 43 pacientes com AF transplantados a partir de indivíduos HLA aparentados. A maioria deles (37) teve doadores HLA

#### QUADRO 13.1

### Método de cultivo celular para investigação da instabilidade cromossômica espontânea e DEB-induzida em casos suspeitos de anemia de Fanconi

O implante das culturas de linfócitos é realizado em tubos de centrífuga estéreis e descartáveis. Culturas para o estudo da instabilidade cromossômica devem se manter como cultura pareada sem a droga para estabelecer o número de quebras cromossômicas espontâneas.

#### Para obtenção de cromossomos metafásicos

Em um tubo são adicionados 6 mL de meio RPMI-1640 contendo antibióticos; 1,2 mL de soro fetal bovino; 0,2 mL de fitoemaglutinina M e 0,5 mL de sangue total. A cultura é mantida a 37°C durante 72 horas, e uma hora antes do término adiciona-se 0,05 mL de colchicina (0,8 µg/mL). Para o estudo das anomalias cromossômicas DEB-induzidas em culturas de sangue periférico utiliza-se a concentração de 0,1 µg/mL desde o início da cultura por 72 horas. Para culturas envolvendo fibroblastos, a concentração da droga DEB é reduzida para 0,01 µg/mL.

#### Citologia, hipotonização e fixação

Após as 72 horas do implante da cultura de linfócitos, centrifuga-se os tubos a 1.800 rpm por 10 minutos e, em seguida, descarta-se o sobrenadante. São adicionados 6 mL de KCl (0,075 M) a cada cultura, é feita a homogeneização, e as amostras são mantidas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, essas amostras são centrifugadas novamente a 1.800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante é descartado, e o *pellet* é homogeneizado. São acrescentados 6 mL de fixador (3:1-metanol:ácido acético) à temperatura ambiente, e as amostras são centrifugadas a 1.800 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é descartado. A lavagem das amostras com fixador é feita até o sobrenadante ficar totalmente límpido.

As lâminas, previamente lavadas e com lençol d'água, são preparadas com 1 a 2 gotas do *pellet* de cada cultura.

As lâminas são coradas com corante standard (Giemsa), contam-se 25 a 50 metáfases tanto nas culturas sem droga como na cultura exposta ao DEB, registrando as anomalias cromossômicas compreendidas em: fragmento (f), anel (r), dicêntrico (dic), lacuna cromatídica (ctg) e cromossômica (csg), quebra cromatídica (ctb) e cromossômica (csb), trirrádios (tr), quadrirrádios (qr), rearranjos (rear), endorreduplicação (end) e pulverização (pvz). Para o cálculo do número de quebras cromossômicas, excluem-se as lacunas. Os rearranjos, incluindo trirrádios e quadrirrádios, contam como duas quebras cada. Células pulverizadas contam como 46 quebras cromossômicas por célula.

compatíveis dos irmãos; os seis restantes eram de doadores aparentados. Durante um período de acompanhamento clínico de aproximadamente 3,7 anos, 40 dos 43 pacientes estavam vivos. Entre os pacientes que apresentaram a síndrome enxerto-hospedeiro e falência do TMO, os doadores eram HLA aparentados ou os pacientes apresentavam uma anomalia citogenética clonal na MO. Os ensaios clínicos utilizando transferência gênica (terapia gênica) no tratamento da AF têm sido utilizados apenas em pesquisa médica.

Diferentes tipos de câncer podem se instalar nos casos de AF, especialmente no trato digestivo e, no sexo feminino, o câncer ginecológico tem-se sobressaído em relação aos outros tipos de câncer (Tabela 13.3). A predisposição ao câncer em idade jovem é uma característica clínica reconhecida há anos na AF. A complicação hematológica (leucemia linfocítica aguda), o câncer de cabeça e pescoço e o câncer ginecológico (cérvice) têm sido um padrão constante entre pacientes com AF, e as neoplasias de cabeça e pescoço estão entre os tumores mais frequentes em pacientes com AF.<sup>7</sup> Com respeito ao aumento relativo de câncer em indivíduos heterozigotos, não há evidências estatísticas consistentes e convincentes. Vários trabalhos recentes apontam para um

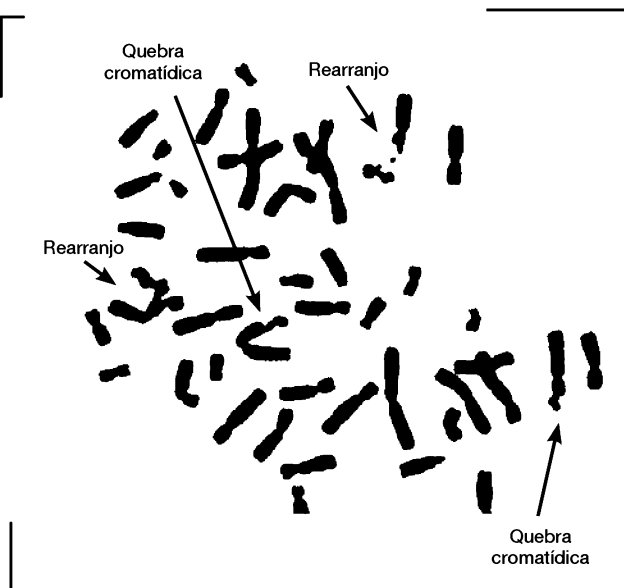
aumento de 500 a 700 vezes na incidência de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço na AF. O risco cumulativo para o desenvolvimento deste tipo de tumor é de cerca de 14% para pacientes com AF que sobrevivam até os 40 anos. A apresentação, distribuição e história natural deste tipo de câncer na AF também são diferentes quando comparadas a indivíduos sem AF (Tabela 13.4).

As neoplasias de cabeça e pescoço, de uma maneira geral, perfazem um grupo de doenças relacionadas com o carcinoma de células escamosas. O câncer pode ocorrer em qualquer camada da mucosa do trato aéreo-digestivo superior, começando pela cavidade oral, nasofaringe e estendendo-se à orofaringe, laringe ou hipofaringe. Cerca de 30.000 novos casos são diagnosticados anualmente e cerca de 30% deles não sobrevivem. Os tumores de cabeça e pescoço estão entre os cinco tipos mais comuns de neoplasias na população. O desenvolvimento destes tumores tem sido correlacionado com o uso de fumo e álcool. Mais recentemente, tem sido sugerido que vírus causadores de câncer, tais como o papilomavírus humano (HPV) e o vírus de Epstein-Barr (EBV), teriam um papel na fisiopatogenia destes tumores.

De uma forma geral, os pacientes com AF desenvolvem os tumores de cabeça e pescoço

**Figura 13.2**

Metáfase de culturas de linfócitos de um paciente com anemia de Fanconi exposta ao diepoxibutano. Observar os diferentes tipos de anomalias cromossômicas estruturais.





sem fatores de risco associados. O comportamento biológico destes tumores na AF é considerado agressivo, com metástase para linfonodos e invasão para os tecidos moles de forma precoce, refletindo, em consequência, um prognóstico clínico pior para os casos de AF.

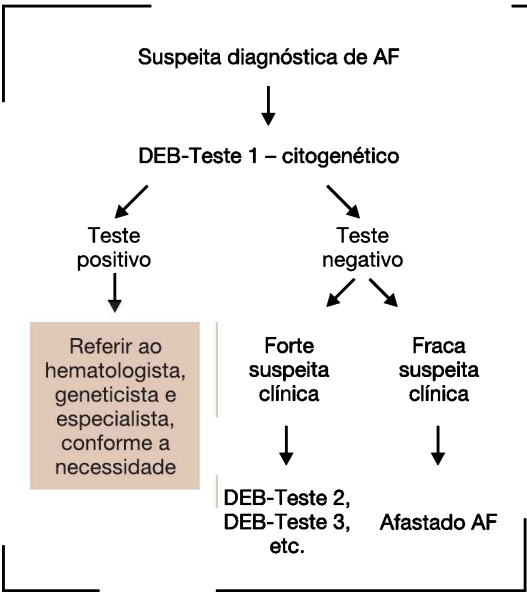
Vários tipos de tumores ocorrem em pacientes com AF que foram submetidos também a transplante de medula óssea. Frequentemente, tais tumores são de língua ou boca. Porém, a maioria dos casos ocorre no contexto da doença enxerto *versus* hospedeiro, em função das drogas imunossupressoras. O câncer de fígado ocorre primariamente nos pacientes que fizeram uso de androgênios e podem ser monitorados pelas provas de função hepática e a  $\alpha$ -fetoproteína a cada 2 a 3 meses, além do ultrassom a cada 6 a 12 meses de intervalo. O monitoramento para o câncer em casos de AF inclui exame clínico pormenorizado a cada 4 a 6 meses e avaliação ginecológica no sexo feminino a cada 6 a 12 meses.<sup>6</sup>

### Genética molecular na anemia de Fanconi

Na AF, 13 grupos de complementação gênica (A-N) foram identificados por es-

tudos em células híbridas somáticas. Em consequência, isso aponta para a existência de pelo menos 13 genes relacionados na AF (*FANCA-FANCN*). A **Tabela 13.5** lista estes genes, porém somente sete deles (*FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* e *FANCL*) estão clonados. A função destes genes à época da sua descoberta era desconhecida; entretanto, em nível celular, credita-se sua participação no processo de reparo do DNA pela formação de um supercomplexo, denominado BRAFT, envolvendo os complexos da via Fanconi e da via Bloom (BLM).<sup>1</sup> Os genes *A*, *C*, *F*, *E*, *G* do grupo Fanconi formam um complexo proteico nuclear responsável pela ubiquitinação da proteína D2 a jusante (gene *FANCD2*) através da ubiquitina ligase *FANCL*, último dos genes identificado na AF e responsável pela mobilização da proteína *FANCD2*, agora monoubiquitinada à cofocalização no núcleo com o produto do gene *BRCA1*, iniciando, consequentemente, o processo de reparo do DNA, em vigência de insultos ao DNA e/ou manutenção da integridade do ciclo celular.<sup>1</sup>

O espectro de mutações para o gene *FANCA* é bastante heterogêneo, e todos os tipos de mutações estão representados (sem sentido,



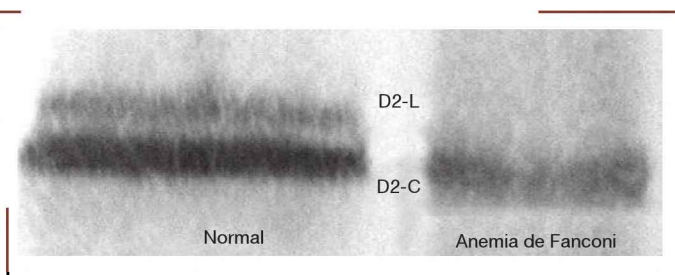
**Figura 13.3**  
Algoritmo diagnóstico na anemia de Fanconi.

sentido trocado, substituições que afetam a fase de leitura, deleções intragênicas), além de um número considerável de polimorfismos. O gene *FANCC* tem um padrão mais restrito de mutações. Uma mutação intrônica, em particular a (IVS4 + 4A→T), tem sido apontada como prevalente entre judeus *ashkenazi* e responsável por um fenótipo mais grave, descrito como VACTERL-H, com instalação precoce do distúrbio hematológico, além de uma sobrevida menor.<sup>16,17</sup> Contudo, tal correlação não foi observada em trabalhos mais recentes em pacientes de outras etnias.<sup>18,19</sup> Informações detalhadas das mutações presentes na AF podem ser encontradas no *website* Anemia de Fanconi.<sup>20</sup> Entre os italianos e sul-africanos (africâners) testados, 100% deles se enquadraram no grupo de complementação A (*FANCA*),<sup>21</sup> enquanto que, para os judeus testados, 80% se enquadraram no grupo de complementação C (*FANCC*). O aumento da frequência de casais consanguíneos entre os casos de AF aponta para a clássica herança mendeliana autossômica recessiva e, desta forma, implica em verdadeiros casos homozigotos. Contudo, diferentes genótipos entre pacientes com AF têm sido observados, caracterizando-os como heterozigotos compostos.

Existem dois modelos animais (FACKOs) com expressão nula para o gene *FANCC*.<sup>22</sup> Os camundongos FACKOs exibem fertilidade reduzida, sensibilidade aumentada para a droga clastogênica DEB ou MMC e instabilidade cromossômica espontânea igual à encontrada na AF em humanos. Contudo, os animais FACKOs não apresentam nenhuma anormalidade hematológica, apesar de tardiamente apresentarem contagens reduzidas de BFU-E e CFU-GM dependentes do  $\gamma$ -interferon. Entretanto, injeções intraperitoneais de MMC induziram uma pancitopenia ou morte precoce. Tais achados indicam que as células hematopoiéticas, assim como outras células na AF, são dependentes da manutenção da integridade genômica, e não de fatores setoriais exclusivos da hematopoiese. Os animais FACKOs não apresentam a frequência aumentada de câncer, como observado em humanos. Recentemente, Pang e colaboradores<sup>23</sup> propuseram que o defeito hematopoiético da AF deriva, em parte, de um desequilíbrio entre os sinalizadores e inibidores mitogênicos, da redução de sinais transdutores aos receptores dos fatores de crescimento que ativam o STAT1 e do fator inibitório do  $\gamma$ -interferon, que não é dependente do STAT1, mas é dependente do *FANCC*.

**Figura 13.4**

**Western Blot** de um paciente com AF (coluna da direita) mostrando apenas a fração curta da proteína D2 (D2-C) (forma não monoubiquitinada) em comparação a um indivíduo normal com ambas as frações da proteína D2 presentes (D2-C e longa, forma monoubiquitinada – D2-L).  
[Imagem cedida pelo Dr. Júlio Paixão – Laboratório de Genética Molecular Aplicada – Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ – RJ].



**TABELA 13.4**  
Apresentação, distribuição e curso natural dos tumores de cabeça e pescoço em pacientes com anemia de Fanconi

	Tumor de cabeça e pescoço na AF	Tumor de cabeça e pescoço na população geral
Incidência cumulativa aos 40 anos de idade	14%	0,038%
Idade de apresentação (média)	31 anos	53 anos
Razão feminino:masculino	2:1	1:2
Uso de álcool e tabaco	16%	> 85%
Sítio do tumor primário	Cavidade oral – 65% Orofaringe – 10% Hipofaringe – 10% Laringe – 10% Desconhecido 5%	Cavidade oral – 27% Orofaringe – 24% Hipofaringe – 8% Laringe – 41%
Desenvolvimento de um segundo tumor	63%	15%
Sobrevida em dois anos	49%	70%
Tratamento	Cirurgia	Cirurgia Radiação Quimioterapia

Referências

1. Wang W. Emergence of a DNA damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet.* 2007 Oct;8(10):735-48.

2. Llerena Jr JC. Síndromes de predisposição ao câncer associadas a defeitos de reparo do DNA: anemia de fanconi, síndrome ataxia-telangiectasia, síndrome de bloom, síndrome de werner e xeroderma pigmentosum. In: Louro ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froés N. *Genética molecular do câncer.* São Paulo: MSG; 2002.

3. OMIM. Online Mendelian Inheritance in man [Internet]. Baltimore: John Hopkins University; c2010. [capturado em 12 jul. 2010]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

4. Giampietro PF, Auerbach AD, Elias ER, Gutman A, Zellers NJ, Davis JG. New recessive syndrome characterized by increased chromosomal breakage and several findings which overlap with Fanconi anemia. *Am J Med Genet.* 1998 Jun 16;78(1):70-5.

5. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1650-5.

6. Owen J, Frohmmayer L, Eiler ME, editors. *Fanconi anemia: standards for clinical care.* 2nd ed. Eugene, OR: Fanconi Anemia Research Fund, Inc.; 2003.

7. Alter BP. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer.* 2003 Jan 15;97(2):425-40.

8. Llerena Jr JC, Fernandes FG, Coelho ALV. Anemia de fanconi e aplasia de medula óssea. *Rev Brasil Hemat Hemot.* 2000; 22 Supl:106.

9. Glanz A, Fraser FC. Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J Med Genet.* 1982 Dec;19(6):412-6.

10. Duckworth-Rysiecki G, Hultén M, Mann J, Taylor AM. Clinical and cytogenetic diversity in Fanconi's anaemia. *J Med Genet.* 1984 Jun;21(3):197-203.

11. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 1973 Aug;33(8):1829-36.

12. Cervenka J, Hirsch BA. Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "idiopathic" aplastic anemia, and Fanconi anemia heterozygotes. *Am J Med Genet.* 1983 Jun;15(2):211-23.

13. Auerbach AD, Sagi M, Adler B. Fanconi anemia: prenatal diagnosis in 30 fetuses at risk. *Pediatrics.* 1985 Nov;76(5):794-800.

14. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in

TABELA 13.5  
Genes da anemia de Fanconi

Gene	Localização cromossômica	Clonado	Éxons	Peso molecular da proteína (da)
FANCA	16q 24.3	Sim	43	165
FANCB*	Xp 22.31	Não	10	95
FANCC	9q 22.3	Sim	15t	63
FANCD1 (BRCA2)	13q 12-13	Não	27	380
FANCD2	3q 25.3	Sim	44	155,162
FANCE	6p 21-22	Sim	10	60
FANCF	11p 15	Sim	1	42
FANCG (XRCC9)	9p 13	Sim	14	68
FANCI	15q 25-26	Não	37	140,147
FANCJ (BRIP1/ BACH1)	17q 22-24	Não	20	140
FANCL (PHF9)	2p 16.1	Sim	14	43
FANCM (HeF)	14q 21.3	Não	23	250
FANCN (PALB2)	16p 12.1	Não	13	140

\* Ligado ao X.

patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. *Am J Med Genet.* 1997 Jan 10;68(1):58-61.

15. de Medeiros CR, Bitencourt MA, Zanis-Neto J, Maluf EC, Carvalho DS, Bonfim CS, et al. Allo-geneic hematopoietic stem cell transplantation from an alternative stem cell source in Fanconi anemia patients: analysis of 47 patients from a single institution. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Oct;39(10):1297-304.

16. Verlander PC, Kaporis A, Liu Q, Zhang Q, Seligsohn U, Auerbach AD. Carrier frequency of the IVS4 + 4 A-->T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4034-8.

17. Cox PM, Gibson RA, Morgan N, Brueton LA. VACTERL with hydrocephalus in twins due to Fanconi anemia (FA): mutation in the FAC gene. *Am J Med Genet.* 1997 Jan 10;68(1):86-90.

18. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, et al. The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1493-8.

19. Coelho JC, Gonzalez S, Fonseca LCG. Absence of IVS4+4A-T in two brazilian Fanconi Anaemia cases with VACTERL-H phenotype. In: 10th International Congress of Human Genetics. May 15-19, 2001, Vienna, Austria.

20. Fanconi Anemia Mutation Database. In: The Rockefeller University. Human genetics and hematology [Internet]. New York: Rockefeller University; c2004-2010. [capturado em 12 jul. 2010]. Disponível em: [www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/](http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/).

21. Savoia A, Zatterale A, Del Principe D, Joenje H. Fanconi anaemia in Italy: high prevalence of complementation group A in two geographic clusters. *Hum Genet.* 1996 May;97(5):599-603.

22. Wong JC, Buchwald M. Disease model: Fanconi anemia. *Trends Mol Med.* 2002 Mar;8(3):139-42.

23. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, et al. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4724-35.

Leitura recomendada

Fanconi Anemia Research Foundation [Internet]. Eu-gene: Fanconi Anemia; c2010. [capturado em 09 set. 2010]. Disponível em: <http://www.fanconi.org>.

# Origem, causas e mecanismos de formação das alterações cromossômicas

## Introdução

A origem das alterações cromossômicas tem sido investigada e vários resultados surpreendentes têm sido publicados. O presente capítulo discute os resultados das últimas pesquisas sobre como surgem as alterações cromossômicas, que podem causar doenças genéticas, câncer e o envelhecimento, dependendo das células atingidas.

As alterações cromossômicas são a causa reconhecida de morte fetal mais frequente na nossa espécie. A origem das alterações cromossômicas depende de vários fatores, incluindo fatores ambientais e genéticos, além de fatores intrínsecos ao indivíduo e ao momento, como o sexo e a idade. A formação do gameta masculino depende de um número de divisões celulares que varia de aproximadamente 35, em um indivíduo de 15 anos, até 840, em homens com idade superior a 50 anos, sendo que estas divisões são suscetíveis a erros, principalmente alterações estruturais. Já o gameta feminino necessita de 24 divisões celulares para ser formado, porém observa-se uma percentagem bem maior de erros de segregação na meiose I materna, pelas diferenças inerentes ao processo de gametogênese, principalmente alterações numéricas.

## Alterações numéricas

### Euploidias

As triploidias têm origem materna em aproximadamente 80% dos casos, com a in-

corporação de um corpúsculo polar no oócito. Menos frequentemente (cerca de 20% dos casos), a origem é paterna, pela fertilização de um oócito por dois espermatozoides.<sup>1</sup>

As tetraploidias têm origem na primeira divisão mitótica (clivagem) do zigoto, na qual os cromossomos se dividem normalmente, mas não ocorre a citocinese, formando apenas uma célula com 92 cromossomos (endomitose). Raríssimos casos foram descritos de fertilização de um oócito normal por três espermatozoides.<sup>2,3</sup>

### Aneuploidias

Uma condição básica para elucidar os mecanismos da não disjunção cromossômica é a determinação precisa da participação parental na origem do cromossomo extra, na divisão meiótica. Desde a identificação dos primeiros humanos aneuploides, quase que meio século atrás, muitas informações foram adquiridas sobre sua origem e etiologia. Sabemos que grande parte das aneuploidias deriva de erros na meiose I materna.

Durante a mitose, uma célula divide-se em duas células-filhas, com número diploide de cromossomos. A meiose deve produzir células haploides a partir de células diploides. Um erro na distribuição dos cromossomos na citocinese produz células-filhas aneuploides. Aproximadamente metade dos abortos espontâneos antes da 15ª semana de gestação é aneuploide, com as trissomias representando a metade dos abortos anormais.<sup>4</sup> Estudos moleculares demonstraram que aneuploidias

autossômicas têm origem predominantemente materna.<sup>1</sup> Na monossomia X (45,X), o X presente é materno em 70 a 80% dos casos – ou seja, nesses casos, o X ou o Y paterno é que foi perdido na meiose ou nos primeiros estágios da embriogênese.<sup>5</sup> Aproximadamente 100% dos casos de trissomia do cromossomo 16, 90% dos casos de trissomia do cromossomo 22, 75% dos casos de trissomia do cromossomo 15 e 65% dos casos de trissomia do 21 são atribuídos a erros durante a meiose I materna. Uma variação considerável na suscetibilidade à não disjunção de diferentes cromossomos na meiose I materna tem sido encontrada. Estas diferenças podem ser, em parte, atribuídas aos diferentes modelos de recombinação entre a meiose de homens e mulheres. Também com estudos moleculares, foi demonstrado que 25% dos casos de trissomia do cromossomo 21 e 10% dos casos de trissomia do cromossomo 15 originam-se de erros na meiose II materna. Aproximadamente 50% dos casos de síndrome de Klinefelter resultam de erros na meiose I paterna.

A não disjunção meiótica é extremamente comum em humanos, sendo que no mínimo 3% de todas as gestações clinicamente reconhecidas são trissômicas.<sup>6</sup> Estudos com marcadores moleculares localizados no cromossomo 21 revelaram que cerca de 4,5% dos casos de síndrome de Down por trissomia livre do cromossomo 21 são causados por erros mitóticos, não tendo influência da idade materna e nem da origem (paterna ou materna) do cromossomo extra.<sup>7</sup> A origem do cromossomo 21 extra foi estudada com marcadores moleculares, sendo materna em 86 a 88% dos casos, cerca de 75% por erros em meiose I e 25% em meiose II. A origem paterna foi evidenciada em 8 a 9% dos casos, com 38 a 50% em meiose I e 50 a 62% em meiose II.<sup>8-10</sup>

A não disjunção durante a meiose I materna é o principal, mas não o único, mecanismo gerador de aneuploidia. A separação prematura dos cromossomos homólogos antes da anáfase I e das cromátides-irmãs antes da meiose II também pode levar à aneuploidia. Essa separação prematura aumenta a probabilidade tanto de cromossomos homólogos quanto de cromátides-irmãs de migrarem para o mesmo polo. Dados clínicos mostram que mais de 50% dos casos de trissomia do cromossomo 18 são causados por falhas de segregação das

cromátides-irmãs durante a meiose II. Em contraste com defeitos meióticos, erros de segregação mitótica pós-zigóticos raramente resultam em gestações trissômicas clinicamente reconhecidas. A trissomia do cromossomo 7 é uma exceção, na qual aproximadamente 60% dos casos resultam de erros mitóticos.<sup>5</sup>

Pangalos e colaboradores<sup>11</sup> demonstraram que o mosaïcismo parental está presente nas gônadas (células das gônadas de um dos indivíduos do casal têm duas linhagens: 47,+21/46) em 40% das famílias com recorrência de trissomia livre do cromossomo 21 em irmãos. Nestes casos, não ocorrem erros de segregação durante a meiose, pois as células aneuploides já estavam presentes nas gônadas de um dos genitores, formando assim gametas com duas cópias do cromossomo 21.

## Idade materna

Devido à grande incidência em neonatos, as trissomias autossômicas 21, 13 e 18 têm grandes consequências individuais e socioeconômicas. A idade materna avançada é o mais bem documentado<sup>12</sup> fator de risco para essas aneuploidias, mas os mecanismos biológicos deste fenômeno ainda estão sob investigação, não existindo influência de raça, geografia ou *status* socioeconômico na relação da idade materna com o risco de trissomia. A idade materna é o fator etiológico mais comum associado à aneuploidia, sendo que os pesquisadores concordam que essa relação resulta de um aumento das chances de ocorrer não disjunção nos ovários com a idade.

## Mecanismos da não disjunção

As cromátides normalmente estão ligadas ao fuso mitótico com a ajuda dos cinetócoros. A reunião dos cromossomos na placa equatorial requer que um cinetócoro de uma das cromátides-irmãs esteja ligado a um polo, pela formação de microtúbulos daquele polo, enquanto o cinetócoro da outra cromátide-irmã deve estar ligado ao outro polo pela formação de microtúbulos a partir deste outro polo. Se a separação das cromátides não ocorrer no tempo certo, pode acontecer uma não disjunção

e as duas cromátides podem ir para a mesma célula-filha.

## Orientação merotélica do cinetócoro

Um dos mecanismos possíveis para que ocorra a perda de cromossomos na anáfase é a orientação merotélica dos cinetócoros, isto é, quando uma única cromátide tem seu cinetócoro ligado por microtúbulos aos dois polos opostos da célula, em vez de ligar-se a apenas um, como ocorre normalmente. Neste caso, a disjunção das cromátides-irmãs é normal, mas uma das cromátides permanece na placa equatorial durante a anáfase, sendo puxada por forças opostas.<sup>13</sup>

## Alterações do fuso mitótico

A formação anormal do fuso mitótico pode ocorrer como resultado de alterações nas proteínas que formam o fuso ou pela formação de mais de dois centrossomos.<sup>14,15</sup> A maioria dos tumores sólidos apresenta aumento do número de centrossomos e da frequência de aneuploidias.<sup>16</sup> A proteína STK15/Aurora2 é uma serina treonina quinase associada à formação dos centrossomos, que pode induzir aneuploidia e apresenta uma expressão aumentada nas linhagens celulares de câncer de colo.<sup>17</sup>

O produto do gene do fuso anormal (asp) é importante para direcionar o fuso mitótico nos polos. Removendo a função da proteína asp da célula, observa-se a perda do centro de organização dos microtúbulos.<sup>18</sup> Alterações funcionais no fuso mitótico também podem causar a perda do movimento cromossômico na anáfase, causando distribuição desigual dos cromossomos nas células-filhas. O movimento unipolar dos cromossomos na anáfase também pode causar aneuploidia. O controle do ciclo celular, que envolve várias proteínas, constitui um mecanismo importante para que não ocorram erros na segregação dos cromossomos, e está descrito em detalhes no Capítulo 4.

## Recombinação

A recombinação mantém os cromossomos homólogos ligados até o período certo para

haver a segregação correta na meiose I. Em modelos animais, mutações que afetam a recombinação entre os cromossomos aumentam a taxa de aneuploidia.

Existe uma relação entre a não disjunção do cromossomo 21 e a recombinação anômala na meiose. Enquanto erros na meiose I estão associados à recombinação reduzida, erros na meiose II materna estão associados à recombinação aumentada entre os cromossomos/cromátides não separados. Desta forma, todos os erros meióticos maternos envolvendo o cromossomo 21 parecem ser iniciados na meiose I. Além disso, os casos de trissomia do cromossomo 21 com origem na meiose I materna estão associados a frequências reduzidas de recombinação meiótica relacionadas à idade.<sup>19</sup> De maneira geral, ocorre mais recombinação na meiose feminina do que na masculina, porém recombinações meióticas próximas aos telômeros são mais frequentes na meiose masculina.<sup>20</sup>

## Efeito intercromossômico (ICE)

Portadores de aberrações cromossômicas balanceadas têm um risco maior de não disjunção de outros cromossomos. Essa evidência surgiu do fato de que pais de indivíduos com síndrome de Down por trissomia livre são mais frequentemente portadores de alterações cromossômicas balanceadas do que o resto da população. Desta forma, o diagnóstico pré-natal está indicado para portadores de alterações cromossômicas balanceadas, mesmo se os possíveis gametas não balanceados não puderem levar a uma prole viável.<sup>1</sup>

## Mecanismos de formação das alterações estruturais

As quebras cromossômicas podem ocorrer em qualquer estágio do ciclo celular, durante  $G_1$ , S,  $G_2$ , mitose ou meiose. Se um cromossomo quebra durante a fase  $G_1$  do ciclo celular, quando o cromossomo é constituído de apenas uma cromátide, a quebra pode passar pela fase S e aparecer como uma quebra das duas cromátides (cromossômica ou isocromatídica) na próxima metáfase. Se uma quebra não levar a um rearranjo cromossômico, o resulta-



do será um cromossomo deletado e um fragmento acêntrico, que será perdido na próxima divisão celular.

De maneira geral, as alterações cromossômicas estruturais *de novo* têm origem preferencialmente paterna. Os gametas masculinos são suscetíveis ao acúmulo de lesões no DNA porque sua capacidade de reparo diminui no final da espermatogênese.<sup>21</sup> Essas lesões podem ser reparadas pelo repertório enzimático do ócito após a fertilização,<sup>22</sup> mas se isso não ocorrer ou se o dano for mal reparado, alterações na fita dupla de DNA podem originar alterações cromossômicas estruturais no zigoto, que persistem no cariótipo constitutivo do indivíduo que será gerado. A grande maioria das alterações cromossômicas estruturais inicia com quebra cromossômica, seguida ou não de rearranjos. Um cromossomo que perde um telômero tem grande probabilidade de se unir a outra molécula de DNA. Duas quebras no mesmo cromossomo podem resultar na formação de um anel cromossômico e dois fragmentos acêntricos, que serão perdidos na próxima divisão celular.

As deleções cromossômicas podem estar associadas a eventos de recombinação entre cromátides-irmãs ou cromátides não irmãs. Para deleções terminais, são mais frequentes os casos de origem paterna (10:1).<sup>23</sup> Já para deleções intersticiais, a origem parental é mais bem distribuída, com uma pequena predominância de origem materna (6:4).<sup>24</sup>

No caso das duplicações, parece que a origem materna é apenas um pouco mais frequente. Porém, para algumas alterações cromossômicas específicas, como a translocação robertsoniana 14;21 *de novo*, os isocromossomos adicionais 8p, 9p, 12p e 18p e os cromossomos isodicêntricos 15 e 22, a origem materna é claramente mais frequente.<sup>20</sup> Algumas duplicações e até triplicações, como as da região 15q11-q13, apresentam mecanismos mais complexos de formação, sendo que múltiplas sequências repetidas podem estar envolvidas.<sup>25</sup>

Os cromossomos envolvidos em translocações robertsonianas foram estudados em vários trabalhos com resultados similares: um significativo excesso de rob(13;14) e rob(14;21) e uma relativa escassez de todas as outras. As mais frequentes parecem ter um mecanismo

de formação diferente das raras. Apesar de ambas as formas ocorrerem predominantemente durante a meiose, as mais comuns têm origem na oogenese, enquanto que as mais raras têm origens menos definidas, mais randômicas.<sup>26</sup> Os produtos de segregação das translocações robertsonianas também têm sido examinados e parece que, enquanto um número igual de descendentes com translocações balanceadas e cromossomos normais é herdado por homens portadores, ocorre um excesso de translocações balanceadas na prole de mulheres portadoras. Além disso, mulheres portadoras de translocações robertsonianas transmitem, mais frequentemente que homens portadores, o produto desbalanceado da translocação robertsoniana.<sup>27</sup>

A formação dos isocromossomos pode envolver diferentes mecanismos. Isocromossomos encontrados em células neoplásicas são formados por quebra centromérica, sugerindo o mesmo mecanismo de formação das translocações de braço inteiro.<sup>28</sup> Já para o isocromossomo do X, frequentemente encontrado na síndrome de Turner, mais de um mecanismo pode ser observado. Lorda-Sanchez e colaboradores<sup>29</sup> demonstraram origem materna em nove dos 14 casos estudados. Destes nove, dois apresentaram heterozigose entre os braços, sugerindo que o mecanismo de formação foi o mesmo das translocações de braço inteiro, enquanto os outros sete casos apresentaram homozigose para todos os *loci* estudados, o que provavelmente indica um erro na divisão centromérica ou troca entre cromátides-irmãs.

A maioria das inversões cromossômicas humanas surge de um evento único, ao acaso, sendo transmitida de geração para geração, já que, na maior parte dos casos, não ocorre seleção contra esse tipo de alteração. Uma proporção significativa de inversões paracêntricas e pericêntricas tem pontos de quebra recorrentes e pode ter sido originada por diferentes mecanismos ou ter uma origem comum, ou seja, as inversões podem ser idênticas por descendente.<sup>30</sup> Em uma revisão de 446 casos de inversões paracêntricas, não foi encontrada nenhuma inversão 18p, 19q, 20q e Yp. As inversões paracêntricas são mais frequentes nos cromossomos 1, 3, 5, 6, 7, 11 e 14, sendo menos frequentes nos cromossomos 4, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e Y. Os braços cromossômicos mais



afetados por inversões são 6p, 7q, 11q e 14q; e os menos afetados são 2p, 2q, 3q, 4q e 6q. As inversões cromossômicas mais frequentes neste estudo foram: 3(p13p25), 6(p12p23), 6(p12p25), 7(q11q22) e 11(q21q23). Dos casos estudados, 8,5% eram inversões *de novo*.<sup>31</sup> Em uma análise de 448 translocações recíprocas e 220 inversões, Youings e colaboradores<sup>32</sup> evidenciaram que 28% das translocações e 8,5% das inversões (a mesma frequência do estudo anteriormente citado) eram *de novo*.

## Infertilidade masculina

A infertilidade masculina tem sido bastante relacionada a anormalidades cromossômicas. Aberrações cromossômicas são muito mais frequentes em homens inférteis do que na população em geral e essa diferença pode ser analisada em pacientes de clínicas de fertilização assistida. Por exemplo, a incidência de síndrome de Klinefelter é 30 vezes maior em homens que procuram clínicas de fertilização<sup>33</sup> e 100 vezes maior quando o problema é especificamente de azoospermia,<sup>34</sup> em comparação com a população em geral. A incidência de rearranjos cromossômicos estruturais também é mais frequente nesses pacientes, com o risco 10 vezes maior.<sup>33,35</sup>

A frequência de anormalidades cromossômicas nos espermatozoides produzidos por pacientes de clínicas de fertilização assistida também apresenta aumento: principalmente dissomia do cromossomo 21 e de cromossomos sexuais. A maioria das anormalidades autossômicas tem origem na meiose I materna, embora alguns casos (menos que 10%) sejam de origem paterna.<sup>36</sup> Estudos imunocitoquímicos revelaram anomalias nos modelos de recombinação em células germinativas de homens inférteis e subférteis.<sup>37</sup> Baixas taxas de recombinação estão associadas a maior suscetibilidade a erros na meiose I.

## Controle de checagem do ciclo celular

O controle do ciclo celular (*checkpoint control*) está representado por alguns mecanismos de vigilância, que podem parar a

progressão do ciclo celular quando anormalidades na síntese de DNA, na formação de quiasmas e nas ligações do fuso com os cinetócoros são detectadas. Durante a meiose, o controle de checagem do fuso acromático pode induzir uma interrupção na meiose e até a morte celular em casos de distúrbios no processo. As diferenças na origem (paterna ou materna) das aneuploidias podem estar relacionadas a diferenças na tolerância do programa meiótico no pareamento e na aceitação de anormalidades. Durante a espermatogênese, as alterações citogenéticas podem dar um sinal de parada e disparar um processo apoptótico, enquanto um controle de checagem mais permissivo levaria os oócitos a progredirem na metáfase II, independentemente das alterações.<sup>38</sup>

## Causas toxicogenômicas, nutrigenômicas e farmacogenômicas

Os agentes mutagênicos podem induzir lesões no DNA nuclear, que podem ser reparadas por diferentes mecanismos de reparo. Lesões não reparadas ou mal reparadas levam a aberrações cromossômicas. Dependendo do agente mutagênico presente, diferentes mecanismos de reparo são ativados. De acordo com alguns cálculos feitos em 1970, o cromossomo 1 contém uma molécula de DNA de 7,5 centímetros de comprimento.<sup>39</sup> Essas dimensões enormes das moléculas de DNA as tornam alvos permanentes de lesões causadas por agentes mutagênicos químicos e físicos. Uma das consequências microscopicamente visíveis destas lesões é a aberração cromossômica.

As quebras de fita dupla de DNA, causadas, por exemplo, por radiação ionizante, alguns antibióticos ou endonucleases, são as lesões com maior efeito biológico já observado e podem, também, ter origem espontânea através de uma variedade de processos celulares. A radiação ionizante é o agente mutagênico mais bem estudado e se apresenta muito eficiente na indução de aberrações cromossômicas em todos os estágios do ciclo celular.<sup>10</sup>

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que componentes da dieta, tais como algumas vitaminas e fibras, inibem a

mutagênese e a carcinogênese. A maior parte do efeito protetor de frutas e vegetais pode ser devida aos micronutrientes. Consumo insuficiente de micronutrientes, como o ácido fólico e as vitaminas C e B<sub>6</sub>, pode danificar o DNA e causar câncer e doenças degenerativas.<sup>41</sup> Se alguns agentes químicos e físicos podem causar quebras cromossômicas, é de se esperar que tanto a dieta quanto alguns medicamentos

utilizados possam produzir alterações significativas tanto em células somáticas como em germinativas. A boa notícia é que hoje se sabe que essa interação entre agentes mutagênicos e DNA pode ser inibida por fatores que agem diretamente sobre o reparo do DNA, aumentando a eficiência desse sistema, ou por agentes que interagem com o agente mutagênico, anulando ou diminuindo seu efeito.

## Referências

- Schinzel A. How human chromosome aberrations are formed. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. [Internet]. Poitiers, France: Jean-Loup Huret, Genetics DIM, University Hospital; 2007 Jul [capturado em 12 jul. 2010]. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromAberFormedID30065ES.html>.
- Sheppard DM, Fisher RA, Lawler SD, Povey S. Tetraploid conceptus with three paternal contributions. Hum Genet. 1982;62(4):371-4.
- Surti U, Szulman AE, Wagner K, Leppert M, O'Brien SJ. Tetraploid partial hydatidiform moles: two cases with a triple paternal contribution and a 92,XXXYY karyotype. Hum Genet. 1986 Jan;72(1):15-21.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet. 1980 Oct;44(Pt 2):151-78.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet. 2001 Apr;2(4):280-91.
- Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. Annu Rev Genet. 1984;18:69-97.
- Antonarakis SE, Avramopoulos D, Blouin JL, Talbot CC Jr, Schinzel AA. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. Nat Genet. 1993 Feb;3(2):146-50.
- Sherman SL, Petersen MB, Freeman SB, Hersey J, Pettay D, Taft L, et al. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. Hum Mol Genet. 1994 Sep;3(9):1529-35.
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, et al. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. Nat Genet. 1996 Dec;14(4):400-5.
- Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, et al. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. Am J Hum Genet. 1996 Mar;58(3):628-33.
- Pangalos CG, Talbot CC Jr, Lewis JG, Adelsberger PA, Petersen MB, Serre JL, et al. DNA polymorphism analysis in families with recurrence of free trisomy 21. Am J Hum Genet. 1992 Nov;51(5):1015-27.
- Penrose LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. 1933. J Genet. 2009 Apr;88(1):9-14.
- Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degraffi F, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. J Cell Biol. 2001 Apr 30;153(3):517-27.
- Pihan GA, Doxsey SJ. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. Semin Cancer Biol. 1999 Aug;9(4):289-302.
- Gisselson D. Chromosome instability in cancer: How, when and why. Adv Cancer Res. 2003;87:1-29.
- Brinkley BR. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. Trends Cell Biol. 2001 Jan;11(1):18-21.
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. EMBO J. 1998 Jun 1;17(11):3052-65.
- do Carmo Avides M, Glover DM. Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers. Science. 1999 Mar 12;283(5408):1733-5.
- Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. Am J Hum Genet. 2005 Jan;76(1):91-9.
- Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed., rev. and expand. Berlin; New York: de Gruyter; 2003.
- Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? Toxicol Appl Pharmacol. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):521-31.

22. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 6;104(45):17725-9.
23. Quarrell OW, Snell RG, Curtis MA, Roberts SH, Harper PS, Shaw DJ. Paternal origin of the chromosomal deletion resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet*. 1991 Apr;28(4):256-9.
24. Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet*. 1996 Dec;5(12):1893-8.
25. Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Peñaherrera M, Michaelis RC, et al. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet*. 1998 Feb;35(2):130-6.
26. Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, et al. Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet*. 2002 Dec;71(6):1456-62.
27. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2004.
28. Jin Y, Jin C, Salemark L, Martins C, Wennerberg J, Mertens F. Centromere cleavage is a mechanism underlying isochromosome formation in skin and head and neck carcinomas. *Chromosoma*. 2000 Nov;109(7):476-81.
29. Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Schinzel A. A molecular study of X isochromosomes: parental origin, centromeric structure, and mechanisms of formation. *Am J Hum Genet*. 1991 Nov;49(5):1034-40.
30. Thomas NS, Bryant V, Maloney V, Cockwell AE, Jacobs PA. Investigation of the origins of human autosomal inversions. *Hum Genet*. 2008 Jul;123(6):607-16.
31. Pettenati MJ, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cospers P, et al. Paracentric inversions in humans: A review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet*. 1995 Jan 16;55(2):171-87.
32. Youings S, Ellis K, Ennis S, Barber J, Jacobs P. A study of reciprocal translocations and inversions detected by light microscopy with special reference to origin, segregation, and recurrent abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2004 Apr 1;126A(1):46-60.
33. Zuffardi O, Tiepolo L. Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human males infertility. In: Crosignani PG, Rubin BL, editors. Genetic control of gamete production and function. New York: Academic Press; 1982. p. 261-73.
34. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in males infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991 Feb;6(2):245-50.
35. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod*. 1998 Mar;13(3):576-82.
36. Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*. 1998 Feb;13(2):313-9.
37. Martin RH. Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3-4):245-9.
38. Pacchierotti F, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U, Mailhes JB. Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ Res*. 2007 May;104(1):46-69.
39. DuPraw EJ. DNA and chromosomes. New York: Holt, Rinehart and Winston; 1970.
40. Natarajan AT, Palitti F. DNA repair and chromosome alterations. *Mutat Res*. 2008 Nov 17;657(1):3-7.
41. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res*. 2001 Apr 18;475(1-2):7-20.

---

## Leituras recomendadas

- Dey P. Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol*. 2004 Dec;57(12):1245-9.
- Griffin DK. The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. *Int Rev Cytol*. 1996;167:263-96.
- Petersen MB, Mikkelsen M. Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;91(1-4):199-203.
- Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol*. 2000 Jan;12(1):82-8.

Roberta Passos Palazzo  
Sharbel Weidner Maluf

# Técnica de aberrações cromossômicas para avaliação do dano de DNA

## Introdução

Uma das consequências biológicas da exposição humana às radiações ionizantes ou aos agentes químicos genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas (ACs), as quais são consideradas importantes marcadores de exposição. Elas representam a parte visível de um grande espectro de alterações no DNA, as quais podem atingir o número ou a estrutura cromossômica.<sup>1,2</sup>

A análise de ACs é um teste de mutagenicidade para a detecção de alterações estruturais, sendo um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Trata-se de um teste de uso generalizado para diversos sistemas e diferentes organismos e tecidos, podendo ser conduzido tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>3</sup>

As ACs estão intimamente relacionadas a doenças como neoplasias, nas quais se verifica uma correlação positiva entre a frequência de ACs nos linfócitos e o desenvolvimento do câncer.<sup>1</sup>

Testes de genotoxicidade *in vitro* têm, geralmente, um nível de sensibilidade muito maior do que testes *in vivo*, tendendo a superestimar a possível atividade mutagênica quando extrapolado para situações *in vivo*.<sup>4</sup>

A indução de aberrações em cromossomos de eucariotos *in vivo* por qualquer agente, além de avaliar a mutagenicidade, é um indi-

cativo de que ele provavelmente também seja carcinogênico, ao menos no organismo avaliado (**Tabela 15.1**). Trata-se de uma avaliação citogenética clássica, internacionalmente aceita para biomonitoramento.<sup>3</sup>

## Origem das aberrações cromossômicas

Os efeitos genotóxicos de um mutagênico potencial dependem dos seus alvos celulares. Alguns químicos necessitam ser metabolizados antes de adquirirem a sua capacidade mutagênica. Os agentes mutagênicos podem induzir alterações genômicas atingindo o DNA direta e/ou indiretamente, pela ação sobre proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (**Figura 15.1**).<sup>5</sup> Por exemplo: a radiação ionizante atinge o DNA diretamente, formando quebras de fita dupla e de fita simples. Os efeitos indiretos da radiação ionizante, por sua vez, ocorrem após a interação de fótons com as moléculas de água, levando à hidrólise e à produção de radicais livres, os quais subsequentemente atacam o DNA e as proteínas.<sup>6,7</sup>

As consequências das interações entre agentes mutagênicos e seus alvos podem levar a diferentes tipos de dano de DNA (adutos de DNA, sítios álcali-lábeis, quebras na fita de DNA) e mutações, que incluem desde alterações de um único nucleotídeo (mutações de genes) a alterações estruturais (mutações de cromossomos) ou, ainda, alterações cromos-

sômicas numéricas (mutações genômicas). O destino da célula é determinado com base na forma em que as diversas lesões infiltradas no genoma são reparadas ou eliminadas via apoptose.<sup>8</sup>

ACs estruturais podem ser induzidas por quebras diretas no DNA, por replicação de um molde de DNA danificado, por inibição na síntese de DNA ou ainda por outros mecanismos (p. ex., inibidores de topoisomerase II). As quebras nas cadeias duplas do DNA são as lesões primárias fundamentais para a formação de ACs, que podem ser induzidas ou espontâneas, sendo que os mecanismos de reparo dessas lesões em células eucarióticas envolvem uma variedade de tipos, levando, na maioria das vezes, à reunião não homóloga do DNA lesionado.<sup>1,2</sup>

Muitos compostos que apresentam resultados positivos no teste de ACs correspondem a carcinogênicos; entretanto, não existe ainda uma correlação perfeita entre o teste e a carcinogenicidade (**Quadro 15.1**). Essa correlação também é dependente da classe do agente químico em questão e, além disso, existe uma crescente evidência de que alguns carcinogênicos não são detectáveis pelo teste em função de aparentemente agirem por mecanismos distintos e não pelo dano direto ao DNA.<sup>9</sup>

Aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico

A frequência de ACs em linfócitos do sangue periférico tem sido aplicada por décadas

como biomarcador de efeitos precoces de carcinogênicos genotóxicos, em abordagens de exposição tanto ambiental como ocupacional (incluindo biodosimetria de radiação). A frequência de ACs pode ser justificada por uma possível exposição, deficiência de micronutrientes ou fatores de suscetibilidade individuais, como metabolismo carcinogênico e polimorfismos relacionados à estabilidade genômica.<sup>10</sup>

Assumindo que os mecanismos de formação de dano cromossômico são similares nos diferentes tecidos, pode-se esperar que o nível de dano em linfócitos reflita o nível de dano de tecidos propensos ao câncer, bem como indicar o risco de neoplasias.<sup>11</sup> A vantagem de estudar linfócitos humanos é que eles circulam por todo o organismo, sendo, portanto, expostos a qualquer agente mutagênico, seja ele físico ou químico, independentemente da origem de entrada (oral, inalatória, dérmica, etc.). Outra vantagem é o fato de os linfócitos serem capazes de refletir danos recentes.<sup>4</sup>

Aberrações estruturais: cromossômicas versus cromatídicas

Aberrações estruturais podem ser de dois tipos: cromossômicas ou isocromatídicas (ACs), quando ocorrem simultaneamente nas duas cromátides de um cromossomo, e cromatídicas (ACTs), quando ocorrem em uma só cromátide. A geração de ACs estruturais requer uma ou diversas quebras de fita dupla de DNA. Entretanto, os mecanismos de formação de ACs e ACTs aparentemente

TABELA 15.1  
Diferenças entre o ensaio de aberrações cromossômicas *in vivo* e *in vitro*

	Vantagens	Desvantagens
<i>In vivo</i>	Os efeitos de um agente genotóxico podem ser observados em um organismo vivo.	A maioria dos estudos é retrospectiva e os resultados precisam ser comparados com controles adequados.
<i>In vitro</i>	Diferentes concentrações do agente podem ser estudadas (inclusive concentrações bem acima das observadas <i>in vivo</i> ).	Não é possível avaliar os efeitos dos metabólitos.

diferem de acordo com o agente mutagênico em questão (radiação ionizante ou químicos) e envolvem também mecanismos específicos de reparo de DNA.<sup>12</sup>

ACSs resultam de quebras de fita dupla não reparadas ou com reparo incompleto, na sua maioria geradas *in vivo*, em linfócitos na fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> do ciclo celular, por clastógenos fase-S-independentes (p. ex., radiação ionizante). Durante a síntese do DNA, as aberrações formadas em G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> são duplicadas, e as quebras e trocas do tipo cromossômicas (p. ex., cromossomos dicêntricos, em anel e translocações balanceadas) são visualizadas na metáfase. As ACTs são formadas predominantemente *in vitro*, durante a fase S de linfócitos em cultura, em resposta à modificação de bases e a quebras de fita única induzidas *in vivo* por clastógenos fase S-dependentes (p. ex., químicos).<sup>2,12</sup>

## Exposições de curto prazo versus exposições de longo prazo

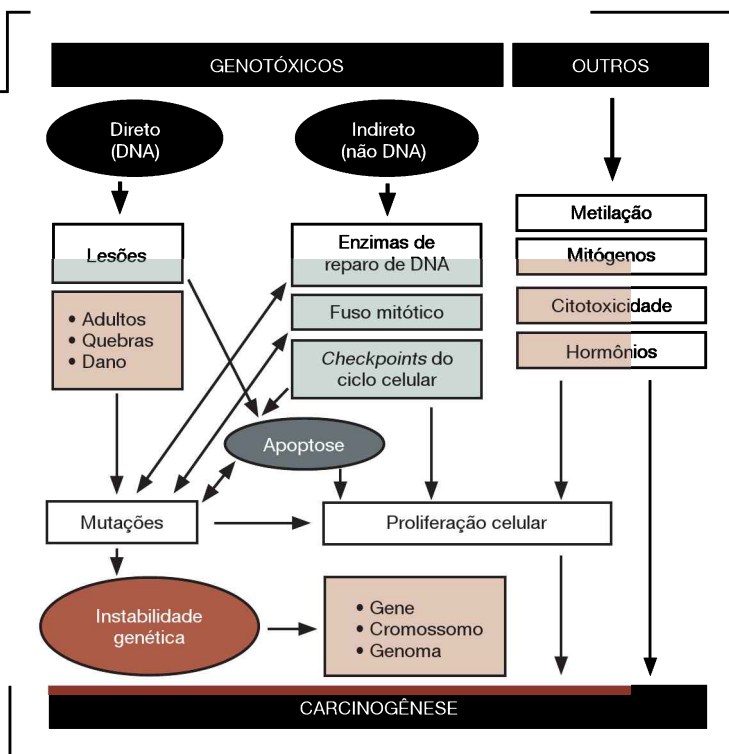
Para o biomonitoramento de exposições cumulativas, ACs estruturais estáveis (p. ex., translocações) correspondem aos biomarcadores mais relevantes. Este tipo de alteração pode ser propagado a gerações celulares posteriores e, por essa razão, permite a avaliação de exposições mais antigas. Os estudos feitos sobre o acidente em Goiânia (BR) com célio-137 possibilitaram demonstrar o desaparecimento progressivo de aberrações instáveis e o contraste com a persistência de translocações, as quais foram observadas utilizando-se técnicas de FISH.<sup>4</sup>

Cromossomos dicêntricos, por sua vez, são facilmente identificados pelo método de co-

**Figura 15.1**

### Mecanismos de ação de genotóxicos que agem diretamente sobre o DNA.

Mutagênicos podem induzir efeitos genotóxicos e câncer atingindo o DNA, tanto direta como indiretamente, pela alteração de proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica (p. ex., tubulinas, enzimas de reparo de DNA, proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, etc.). Compostos não genotóxicos também são capazes de induzir o câncer, aumentando o intervalo de proliferação celular (p. ex., mitógenos), modificando o *status* de metilação do DNA ou desencadeando citotoxicidade. A proliferação celular pode ser um efeito primário da carcinogênese, ou um efeito secundário consequente da toxicidade celular. A apoptose pode ser induzida por diversos tipos de genotóxicos. A eliminação excessiva de células por apoptose pode induzir uma proliferação celular compensatória para restaurar a homeostase. A carcinogênese é, portanto, o resultado do balanço entre mutações, mudanças epigenéticas, proliferação celular e morte celular.





## QUADRO 15.1

**Protocolo – teste *in vitro* de aberrações cromossômicas<sup>9</sup>**

**Introdução:** para o teste *in vitro*, geralmente é necessário utilizar uma fonte exógena de ativação metabólica. Esse sistema de ativação, no entanto, não reproduz totalmente as condições *in vivo* de mamíferos. É preciso ter cuidado, também, para evitar condições que possam conduzir a um resultado positivo, mas que não seja decorrente de mutagenicidade intrínseca e sim de alterações no pH, na osmolaridade ou de altos índices de citotoxicidade.

**Princípios do teste:** culturas celulares (com e sem ativação metabólica) são expostas a determinada substância a ser testada. Em intervalos predeterminados, após a exposição das culturas, é aplicado um composto químico que paralisa as células em metáfase (p. ex., colcemid ou colchicina). Posteriormente, as culturas são processadas e coradas, e as metáfases celulares são analisadas ao microscópio para a presença de ACs.

**Descrição do teste**

- Células: uma variedade de linhagens celulares, ou culturas celulares primárias, incluindo células humanas, pode ser utilizada (p. ex., fibroblastos de hamster chinês, linfócitos do sangue periférico de humanos ou outros mamíferos).
- Preparação das culturas: no caso da utilização de linfócitos, o sangue total é primeiramente tratado com um anticoagulante (p. ex., heparina). Os linfócitos também podem ser separados, antes da cultura. As amostras são adicionadas a um meio de cultura contendo um mitógeno (p. ex., fitoemaglutinina) e incubadas a 37°C.
- Ativação metabólica: as culturas devem ser expostas ao composto em teste, na presença e na ausência de um sistema apropriado de ativação metabólica. O sistema mais comumente utilizado é o S9. As condições do sistema de ativação metabólico dependerão da classe do químico a ser testado.
- Concentrações das exposições: dentre os critérios para a determinação da maior concentração aplicada estão a citotoxicidade, a solubilidade no sistema do teste e as modificações no pH ou na osmolaridade.
- Controles: em cada experimento, devem ser incluídos controles positivos e negativos (solvente ou veículo), ambos com e sem a ativação metabólica.
- Tratamento com a substância do teste: no caso da utilização de linfócitos, o tratamento deve ser feito em torno de 48 horas após a estimulação do mitógeno.
- Tempo de cultura: as culturas devem ser expostas à substância em teste por 3 a 6 horas e então incubadas por um período equivalente a cerca de 1,5 do comprimento do ciclo celular normal.
- Preparação dos cromossomos: as culturas celulares geralmente são tratadas com colcemid ou colchicina de 1 a 3 horas antes do seu processamento. A preparação dos cromossomos envolve o tratamento hipotônico das células, a fixação e a coloração.
- Análise: pelo menos 200 metáfases bem definidas devem ser consideradas por concentração e controle, igualmente divididas entre as duplicatas, se aplicável. Esse número pode ser reduzido quando forem observadas quantidades maiores de aberrações.

**Análise dos resultados:** a unidade experimental em questão é a célula; portanto, a porcentagem de células com ACs estruturais deve ser avaliada. Diferentes tipos de ACs estruturais devem ser listados juntamente com seus respectivos números e frequências, para culturas experimentais e controles. Os gaps são registrados separadamente e em geral não estão incluídos no total de frequência de aberrações.

**Avaliação e interpretação dos resultados:** existem diversos critérios para a determinação de resultados positivos, tais como aumento reproduzível de células com ACs ou relacionado com a concentração. Métodos estatísticos podem ser utilizados como um complemento na avaliação dos resultados; entretanto, eles não devem ser o único fator determinante de um resultado positivo.

(continua)

**QUADRO 15.1 (continuação)**

**Obs. 1:** existem três métodos principais de visualização de cromossomos aplicada à análise de ACs: a coloração com Giemsa, as técnicas de bandeamento e a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). A análise por coloração com Giemsa é limitada à quantificação de ACs (quebras, *gaps*). A técnica de bandeamento G, por sua vez, é mais informativa e permite definir o sítio de quebra preferencial nos cromossomos. Já a técnica de FISH, com utilização de sondas centroméricas e pericentroméricas, tem sido amplamente utilizada na detecção de ACs numéricas.<sup>13</sup>

**Obs. 2:** a sensibilidade (menor dose detectável/concentração) do ensaio de ACs depende do tipo de mutagênico avaliado. No caso particular da exposição à radiação ionizante, ACs estruturais podem ser detectadas a partir de doses de 0,5 a 1 Gy.<sup>5</sup>

loração clássica com Giemsa, que representa um biomarcador bastante atrativo, especialmente no acesso de casos de exposição recente,<sup>5</sup> podendo ser quantificado pela técnica de micronúcleos, através das pontes nucleoplasmáticas (ver Capítulo 17). Estas estruturas são bem mais instáveis que as translocações – portanto, em um período de 3 a 4 anos após a exposição, a maior parte dessas anormalidades não é mais visualizada.<sup>4</sup>

## Tipos de aberrações cromossômicas estruturais observadas

Os exemplos utilizados seguem o sistema de nomenclatura internacional.<sup>14</sup>

- **Cromossomos dicêntricos (dic):** cromossomo formado a partir da quebra de dois cromossomos e da união dos segmentos com centrômero. Um cromossomo dicêntrico é contado como um cromossomo na nomenclatura.

### Exemplos:

#### 45,XX,dic(13;13)(q14;q32)

Ocorreu quebra e junção nas bandas 13q14 e 13q32, nos dois cromossomos 13 homólogos, para formar um cromossomo dicêntrico. Não existe cromossomo 13 normal. Se não for possível demonstrar que o cromossomo dicêntrico foi originado pela quebra e reunião das cromátides-irmãs, pode ser designado, por exemplo, como dic(13)(q14q32).

#### 45,XX,dic(13;15)(q22;q24)

Quebras na banda q22 do cromossomo 13 e q24 do cromossomo 15, com posterior união para formar um cromossomo dicêntrico.

- **Associação telomérica (tas):** em associações teloméricas envolvendo dois cromossomos, o cromossomo sexual ou o autossômico de menor número é especificado primeiro. As bandas terminais dos cromossomos envolvidas na associação telomérica são indicadas no segundo parênteses. Cromossomos envolvidos em associações teloméricas são contados como cromossomos separados.

### Exemplo:

#### 46,XX,tas(12;13)(q24.3;q34)

Associação entre as regiões teloméricas dos braços longos dos cromossomos 12 e 13.

- **Quebra cromossômica (chrb):** é uma descontinuidade no mesmo *locus* de ambas as cromátides de um mesmo cromossomo, originando um fragmento acêntrico e um cromossomo monocêntrico anormal (**Figura 15.2**).

### Exemplo:

#### Chrb(14)(q24)

Quebra nas duas cromátides na banda q24 do cromossomo 14.

- **Quebra cromatídica (chtb):** é uma descontinuidade de uma única cromátide, na qual existe um desalinhamento claro (**Figura 15.2**).



**Exemplo:****chtb(3)(p24)**

Quebra cromatídica na banda p24 do cromossomo 3.

- **Falha cromossômica (chrg):** é uma região não corada (lesão acromática) no mesmo *locus* de duas cromátides-irmãs, onde existe um desalinhamento mínimo das cromátides (**Figura 15.3**).

**Exemplo:****chrg(12)(q15)**

Falha nas duas cromátides na banda q15 do cromossomo 12.

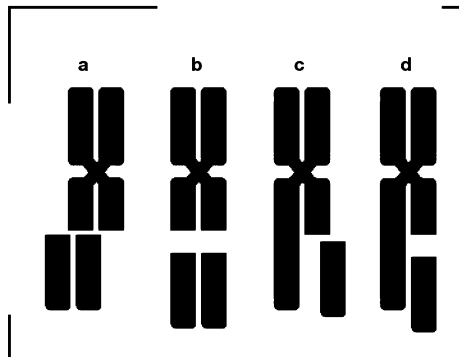
- **Falha cromatídica (chtg):** é uma região não corada (lesão acromática) de uma única cromátide na qual existe um desalinhamento mínimo (Figura 15.3).

**Exemplo:****chtg(5)(q22)**

Falha cromatídica na banda q22 do cromossomo 5.

## O destino das células portadoras de aberrações cromossômicas

Tendo em vista que as ACs estruturais podem ser induzidas por quebras de DNA, as consequências dessas alterações dependem do que ocorrer a partir das quebras, as quais podem ser totalmente reparadas (de modo que a forma original do cromossomo é restaurada); reunidas de forma incorreta ou não sofrer reparo. Os dois últimos casos podem ser observados ao microscópio, em células em metáfase. O tipo de AC é determinante para o destino celular. Se a célula abriga aberrações instáveis (p. ex., cromossomos dicêntricos, em anel ou fragmentos), ela pode ser eliminada por apoptose, em uma via p53-dependente. Entretanto, no caso de alterações estáveis (p. ex., translocações balanceadas), podem ocorrer efeitos deletérios ao organismo, já que a indução de apoptose é bem menos efetiva nesses casos.<sup>15</sup>

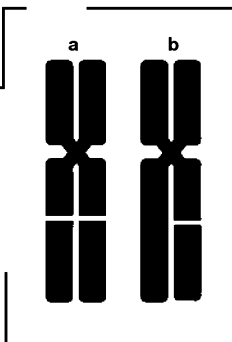


**Figura 15.2**

Ilustração de quebras cromossômicas e cromatídicas. (a) e (b) Quebra isocromatídica ou cromossômica. (c) e (d) Quebra cromatídica.

**Figura 15.3**

Ilustração de falhas cromossômicas e cromatídicas. (a) Falha isocromatídica ou cromossômica. (b) Falha cromatídica.



## Referências

1. Takahashi CS. Testes citogênicos in vitro. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editores. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA; 2003. p. 152-72.
2. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res*. 2000 Aug;463(2):111-72.
3. Villela IV, Lau A, Silveira J, Prá D, Rolla HC, Silveira JD. Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance; 2003. p.147-56.
4. Garcia-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jun-Jul;1779(6-7):363-75.
5. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006 Nov;88(11):1515-31.
6. Nias AHW. *An Introduction to Radiobiology*. 2nd ed. Chichester: John Wiley&Sons; 1998, p. 4.
7. Dowd S, Tilson E. *Practical radiation protection and applied radiotherapy*. Philadelphia: Saunders; 1999. p. 118-20.
8. Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis*. 2002 Jul;17(4):337-44.
9. OECD. Guideline for the testing of chemicals: *In Vitro* Mammalian chromosome aberration test [Internet]. Paris: OECD; 1997. [capturado em 2010 Jul 12]. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/18/33/1948434.pdf>
10. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*. 2004 Apr 1;149(1-3):309-34.
11. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*. 2006 Aug 30;600(1-2):37-45.
12. Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, et al. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2258-63.
13. Holecková B, Piesová E, Sivikova K, Dianovský J. Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agric Environ Med*. 2004;11(2):175-9.
14. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. *ISCN 2009 an International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger; 2009.
15. Schwartz JL, Jordan R. Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by p53-dependent apoptosis. *Carcinogenesis*. 1997 Jan;18(1):201-5.

## Troca entre cromátides-irmãs

As trocas entre cromátides-irmãs (SCEs, de *sister chromatid exchange*) representam manifestações citológicas de permutas entre produtos de replicação do DNA, em *loci* homólogos das cromátides-irmãs de um cromossomo duplicado.<sup>1</sup> O processo de troca envolve quebras na cadeia de DNA e posterior reunião.<sup>2</sup>

O emprego desse teste na avaliação de respostas citogenéticas a exposições químicas é comum,<sup>3</sup> e excelentes relações dose-resposta de vários agentes químicos têm sido estabelecidas em uma grande variedade de experimentos *in vitro* e *in vivo*, em humanos e animais de laboratório.<sup>1</sup>

Diferentes eficiências de indução a danos no DNA são observadas durante a ação de cada agente testado, e cada tipo de lesão gerada parece ser processado diferentemente pela célula, resultando em tipos diferenciados de dano.<sup>4</sup> As variáveis capazes de influenciar a indução de SCEs incluem o tipo de célula estudada, a habilidade inerente ao organismo testado de metabolizar o agente em questão, a exposição prévia e/ou concomitante do sistema testado a outros agentes, e o tempo em que as células do sistema testado são expostas no ciclo.<sup>5</sup> Determinados quimioterápicos, drogas antineoplásicas, infecções bacterianas e virais, doenças crônicas e malignidades

podem exercer influência na frequência de SCEs.<sup>6</sup> Como exemplos de agentes indutores de SCEs avaliados em estudos anteriores, podemos citar:

- Agentes alquilantes: etilmetanossulfonato (EMS), mitomicina C (MMC);
- Corantes que se ligam ao DNA: daunorubicina;
- Bases análogas: bromodeoxiuridina (BrdU – análogo de timina);
- Irradiação: luz UV, BrdU + luz;
- Vírus: vírus símio 40 (SV40);
- Demais agentes: acetaldeído.

Mesmo ainda possuindo bases moleculares obscuras, a formação de SCEs é, aparentemente, consequência de erros na replicação do DNA, possivelmente na própria força de replicação. A análise das SCEs, após exposições *in vivo*, demonstra persistência e acúmulo limitados, refletindo nos processos de reparo do DNA, assim como no *turnover* celular.<sup>1</sup> Experimentos indicam que a formação de SCEs pode ser mediada por recombinação homóloga,<sup>3,7</sup> sugerindo que interrupções na força de replicação levam a um aumento na frequência de recombinações – evidência si-

milar às fases iniciais da recombinação homóloga, resultando na formação de SCEs.<sup>7</sup>

Estudos demonstram que não há associação direta entre indução de SCEs e efeitos celulares adversos ou consequências na saúde dos indivíduos estudados. Portanto, essa análise possui valor limitado para avaliações de risco, podendo ser empregada como dosímetro biológico ou como biomarcador de exposição.<sup>1,2</sup> O ideal é utilizar outra técnica, como a de aberrações cromossômicas ou de micronúcleos, concomitantemente.

As SCEs são muito sensíveis como indicadores de efeitos genotóxicos, quando comparadas, por exemplo, a aberrações estruturais. Porém, as SCEs não são indicadoras de efeito mutagênico.<sup>1</sup> A habilidade de químicos genotóxicos de induzirem um aumento significativo de SCEs em culturas celulares e em amostras de células provenientes de animais tratados, além da facilidade da análise de SCEs, tem tornado essa técnica atrativa para ensaios de curta duração (**Quadro 16.1**).

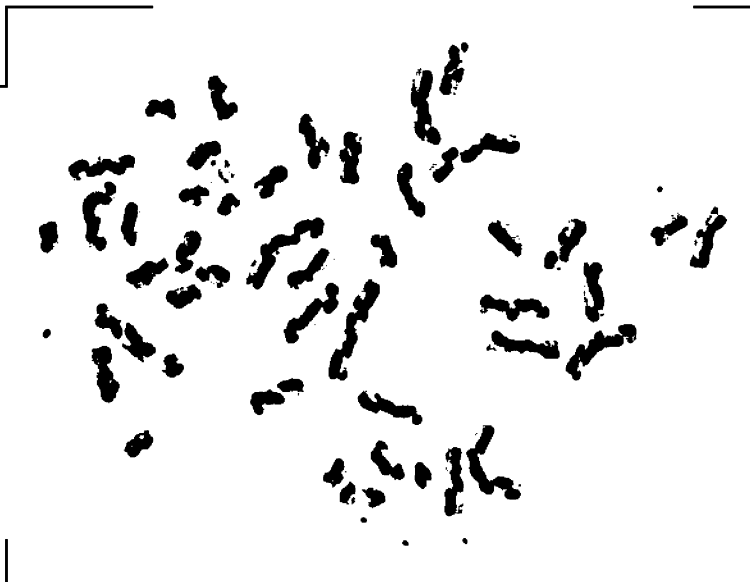
Entretanto, a carência de especificidade para a detecção de atividade mutagênica, o mecanismo de formação incerto e a duvidosa significância biológica da SCE têm levado ao seu uso reduzido, não sendo utilizada frequentemente, como um teste de rotina na genética toxicológica.<sup>2</sup>

Os níveis de SCEs em linfócitos do sangue periférico são utilizados como um índice do potencial mutagênico relacionado a fatores ambientais. Não é apropriada a utilização de níveis elevados de SCEs na avaliação do risco de câncer, pela falta de associação dessa resposta a algum efeito celular.<sup>1</sup> Os níveis basais de SCEs flutuam entre indivíduos e estudos realizados, mas, em média, 10 SCEs ocorrem espontaneamente em ciclos celulares humanos normais, o que reforça a relação entre SCE e replicação do DNA.<sup>3</sup>

A detecção de SCEs exige alguns recursos para marcar diferencialmente as cromátides-irmãs, sendo que o método mais utilizado é o da replicação do DNA na presença do nu-

**Figura 16.1**

Metáfase de um paciente com síndrome de Bloom exibindo várias SCEs. O diagnóstico desta síndrome é realizado com a técnica de SCE (ver Capítulo 13) (cedida por Riegel, M. Medical Genetics Institute, Universität Zürich).



**QUADRO 16.1****Descrição da técnica**

O sangue coletado deve ser mantido em tubos heparinizados. Recomenda-se que as amostras sejam processadas dentro de 24 horas, a partir do momento da coleta – caso não seja possível, o sangue periférico pode ser mantido sob refrigeração (temperatura abaixo de 8°C) por alguns dias. As amostras de sangue periférico ou de células mononucleares isoladas são adicionadas a um meio de cultura contendo fitoemaglutinina (PHA) e BrdU, incubado a 37°C.

As culturas devem ser cuidadosamente protegidas da luz em todas as etapas até o processamento, a fim de evitar a fotólise do BrdU. A concentração de BrdU utilizada não deve afetar a cinética celular (normalmente 10 a 20 µM), sendo que o BrdU deve ser adicionado ao meio no início da cultura ou não mais de 24 horas após a adição do mitógeno (PHA), evitando, assim, um padrão de coloração confuso. A precisão das soluções de BrdU utilizadas e a concentração de BrdU no meio são considerações importantes, já que o BrdU influencia os níveis de SCEs. São estabelecidas culturas duplicadas para cada amostra sanguínea, porém um maior número de culturas pode ser designado, se considerado necessário.

A incorporação de BrdU nas células em replicação permite a identificação inequívoca de células metafásicas na segunda divisão. O tempo de cultura deve ser determinado de acordo com o sistema de cultura utilizado, devendo resultar em uma proporção adequada de células metafásicas na segunda divisão celular, facilitando, assim, a posterior análise.

As culturas celulares são tratadas com colchicina, geralmente 1 ou 2 horas antes da interrupção da cultura. O processamento do material retirado é realizado através de soluções hipotônicas (0,075 M KCl) e fixadoras (3 metanol:1 ácido acético), da mesma maneira que no exame de cariótipo. Uma vez fixadas, as células podem ser armazenadas por um tempo praticamente indeterminado em solução fixadora (em temperatura de 4 a -20°C). As lâminas são preparadas de acordo com metodologias padronizadas, e as células devem ser coradas utilizando-se um método de coloração adequado, que permita uma boa diferenciação das cromátides-irmãs.

O número de células metafásicas a serem analisadas deve ter como base a frequência de SCEs usualmente observadas em estudos já realizados, ou em expectativas com base em um controle histórico de dados. Como isso nem sempre é possível, para a finalidade de identificação de uma possível presença de pequena proporção (~10%) de células com elevada frequência de SCEs, recomenda-se a avaliação de 80 células por indivíduo.

A busca ao microscópio das células metafásicas deve ser realizada com objetivas de menor aumento (10x ou 20x), e as células aparentemente intactas, com cromossomos espalhados, devem ser examinadas em aumento de 1.000x, com óleo de imersão. Apenas as metáfases da segunda divisão, identificadas pelo padrão de coloração uniforme e diferenciado, contendo 46 centrômeros, devem ser consideradas e analisadas. Cada permuta de coloração entre as cromátides-irmãs é contada como uma SCE. Trocas de colorações nos centrômeros podem resultar em vieses nos resultados, portanto não devem ser consideradas.

A frequência de SCEs é calculada para cada indivíduo, não havendo um método estatístico estabelecido para aplicação. O teste estatístico a ser utilizado depende, portanto, da distribuição dos dados.

O aumento estatisticamente significativo na frequência de SCEs entre a população exposta, em comparação à população controle, é considerado um resultado positivo. Ou seja, o agente em questão foi capaz de induzir erros na replicação e danos no DNA dos linfócitos referentes aos indivíduos expostos. O embasamento para o resultado positivo se deve à relação dose/resposta quando indivíduos com diferentes níveis de exposição são considerados.

Fonte: Adaptado de Albertini e colaboradores.<sup>2</sup>

cleosídeo halogenado BrdU por dois ciclos celulares consecutivos ou, ao menos, no primeiro dos dois ciclos celulares consecutivos que ocorrem em cultura.<sup>2</sup> Esse método pode ser realizado em qualquer célula eucariótica capaz de incorporar o marcador por um ciclo de replicação e, em seguida, ser submetida a um segundo ciclo de replicação, no qual a presença do marcador é opcional.<sup>1</sup>

Assim como ocorre com outras técnicas utilizadas para o monitoramento de populações, quanto ao efeito genotóxico, estudos com o teste de SCE devem ser seguidos de informações específicas sobre a população estudada, tais como estilo de vida, estado de saúde e fatores intrínsecos, como a idade e o sexo. Ou seja, todas as informações que possam exercer influência sobre os níveis de SCEs devem ser apuradas. Além disso, os genótipos dos genes de metabolismo e dos genes de reparo de DNA devem ser levados em consideração na avaliação dos resultados.

Culturas de linfócitos do sangue periférico propiciam a detecção de SCEs, as quais são geradas durante a fase S do ciclo celular, a partir de lesões preexistentes no DNA. Para a otimização das coletas de linfócitos do sangue periférico, a fase mais adequada para a obtenção das amostras é durante uma exposição crônica, onde se presume que a indução e o reparo do dano no DNA dos linfócitos estejam em estado de equilíbrio. Após uma exposição aguda ou término de uma exposição crônica a um agente genotóxico, o tempo ótimo de coleta para a detecção do dano induzido de DNA é dentro de poucas horas após o término da exposição. É esperado que a frequência de SCEs induzidas diminua com o aumento do tempo entre a exposição e a coleta de sangue – isso ocorre devido a três fatores: a ação do sistema de reparo, a perda de células sanguíneas com danos por apoptose ou necrose e o *turnover* celular. A **Figura 16.1** mostra uma metáfase exibindo várias SCEs.

## Referências

1. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 1996 Sep;365(1-3):147-59.
2. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res.* 2000 Aug;463(2):111-72.
3. Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid Exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):5166-9.
4. Villela IV, Lau A, Silveira J, Prá D, Rolla HC, Silveira JD. Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance; 2003, p.147-56.
5. Latt SA. Sister chromatid exchange formation. *Annu Rev Genet.* 1981;15:11-55.
6. Ikbal M, Ezirmik N, Tos T, Pirim I. Association of sister chromatid exchange frequencies in patients with ankylosing spondylitis with and without HLA-B27. *Ann Rheum Dis.* 2003 Aug;62(8):775-7.
7. Matsuoka A, Lundin C, Johansson F, Sahlin M, Fukuhara K, Sjöberg BM, et al. Correlation of sister chromatid exchange formation through homologous recombination with ribonucleotide reductase inhibition. *Mutat Res.* 2004 Mar 22;547(1-2):101-7.

## Leitura recomendada

Perry PE, Thomson EJ. The methodology of sister chromatid exchange. In: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C, editors. *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 495-530.

# Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular

## Introdução

A avaliação da frequência de micronúcleos (MNs) em linfócitos do sangue periférico é extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para determinar a presença e a extensão de dano cromossômico em populações humanas expostas a agentes genotóxicos, ou em perfis genéticos de suscetibilidade.<sup>1</sup> Esse ensaio é aplicado também com sucesso na identificação de dietas e fatores genéticos com impacto significativo sobre a estabilidade genômica. Pode-se afirmar que o teste detecta agentes genotóxicos clastogênicos e interferentes da formação do fuso mitótico (os quais afetam a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular).

Em comparação à técnica de aberrações cromossômicas (ACs), a avaliação de MNs é mais simples, requer menos treinamento e menos tempo de análise. Além disso, o teste de MNs pode conferir maior sensibilidade ao estudo, em virtude da amplitude estatística que pode ser alcançada com a análise de um número maior de células, frente às poucas centenas geralmente avaliadas para ACs.

## Evolução da técnica

O teste de MNs foi descrito pela primeira vez em medula óssea de camundongo, em 1973, por Heddle. A frequência de MNs em linfócitos do sangue periférico humano foi estudada por Countryman e Heddle,<sup>2</sup> mos-

trando a possibilidade de se medir o dano cromossômico através de um tecido de mais fácil acesso. A dificuldade dessa técnica era distinguir as células que, em cultura, haviam passado por um ciclo de divisão daquelas que não haviam se dividido.

Fenech e Morley,<sup>3</sup> em 1985, utilizaram citocalasina B para bloquear a citocinese celular e diferenciar as células que passaram por um ciclo de divisão. Essa substância inibe a polimerização da proteína actina, a qual participa da formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e a clivagem da célula-mãe em duas células-filhas.<sup>4</sup> Desta maneira, apenas as células que passam por um ciclo de divisão (células binucleadas) são consideradas na análise de frequência de MNs. O ensaio ficou conhecido como técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN, de *cytokinesis-block micronucleus*).

A CBMN é o método preferencial para a avaliação de MNs em culturas humanas e/ou de outros mamíferos, pois, conforme mencionado, a contagem é especificamente restrita às células que passaram por um ciclo de divisão, identificadas pelo seu aspecto binuclear. A restrição da análise às células binucleadas previne interferências causadas por problemas na cinética da divisão celular, o que corresponde à maior variável do ensaio.<sup>5</sup> Os linfócitos que não passam por um ciclo de divisão celular não têm a capacidade de originar MNs. Sendo assim, a sua inclusão na análise subestima a frequência de danos.<sup>6</sup>

A avaliação de MNs também pode ser feita em células epiteliais esfoliadas (p. ex., mucosa



oral, nasal e urotelial), células mononucleares do sangue periférico (p. ex., linfócitos isolados) e eritrócitos. O tecido examinado deve ser escolhido com base em conhecimentos prévios sobre o mecanismo de ação do agente a ser estudado.<sup>7</sup> Os linfócitos T analisados na CBMN são células que circulam por diferentes órgãos antes de retornar ao sangue periférico, podendo passar anos e até mesmo décadas acumulando mutações no seu DNA, produzidas pela exposição durante a sua existência.<sup>8</sup>

## Metodologias

### CBMN em cultura de linfócitos a partir de sangue total<sup>6</sup>

1. Coletar sangue periférico em seringa descartável ou tubo estéril heparinizado. Processar o material preferencialmente até quatro horas após a coleta.
2. Em frasco de cultura contendo 5 mL de RPMI + 10 a 20% de soro bovino fetal + 1 a 2% de fitoemaglutinina A, adicionar aproximadamente 0,5 mL de sangue e incubar a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 44 horas.
3. Após 44 horas, adicionar 6 µg de citocalasina B/mL da cultura e conservar na estufa por mais 28 horas.
4. No final das 72 horas, transferir a cultura para um tubo de centrifuga e centrifugar a 800 rpm por cinco minutos.
5. Descartar o sobrenadante, agitar levemente o sedimento, adicionar lentamente pela parede do tubo 5 mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075 M) e ressuspender.
6. Centrifugar novamente, descartar o sobrenadante, agitar levemente o sedimento e adicionar 5 mL de fixador (metanol/ácido acético 5:1). Acrescentar três gotas de formaldeído e agitar novamente o tubo.
7. Repetir o procedimento anterior mais duas vezes, utilizando fixador 3:1, sem o formaldeído.
8. Descartar o sobrenadante deixando aproximadamente 1 mL no tubo e ressuspender.
9. Gotejar (2 a 4 gotas/lâmina) a suspensão de células sobre lâminas previamente lavadas e deixar secar a temperatura ambiente.

10. Corar as lâminas com solução de Giemsa 5%, por sete minutos.

### Atenção!

Diversos estudos em linfócitos humanos demonstraram que a frequência de MNs aumenta proporcionalmente ao tempo de cultura, com ou sem a citocalasina B. A razão para esses achados ainda não é clara, mas eles poderiam estar refletindo diferentes intervalos de crescimento de subpopulações de linfócitos com diferentes frequências de base de MNs, células alteradas com ciclo celular prolongado, condições de cultura deteriorantes ou maior micronucleação do cromossomo X ao longo do tempo de cultura.<sup>9</sup>

### CBMN em cultura de linfócitos isolados<sup>6</sup>

1. Coletar sangue periférico em seringa descartável ou tubo estéril heparinizado.
2. Diluir o sangue na proporção 1:1 com solução salina estéril 0,85%.
3. Transferir a diluição para um tubo estéril contendo *Ficoll Paque*® na proporção 1:3.
4. Centrifugar a 1.500 rpm por 25 a 40 minutos.
5. Coletar, com uma pipeta Pasteur estéril, o plasma e a camada de linfócitos e transferir para outro tubo estéril com solução de Hanks (3 a 5 vezes o volume do plasma + linfócitos). Centrifugar a suspensão a 1.000 a 1.500 rpm, por 5 a 10 minutos.
6. Descartar o sobrenadante, suspender as células em solução de Hanks estéril (2 a 5 vezes o volume) e centrifugar por cinco minutos a 1.000 a 1.500 rpm.
7. Descartar o sobrenadante e suspender as células em 1 mL de meio RPMI estéril.
8. Medir a concentração de células e ajustá-las pela porcentagem de células viáveis, avaliadas pelo método de exclusão usando *azul de tripan*.
9. Suspender as células (0,5 – 1,0 x 10<sup>6</sup> células/mL) em meio RPMI estéril contendo 10 a 15% de soro bovino fetal e fitoemaglu-



tinina A (10  $\mu\text{L/mL}$ ) e incubar a 37°C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , por 44 horas.

10. Seguir os procedimentos descritos para cultura de linfócitos com sangue total a partir do item 3.

## Análise das células binucleadas

Na análise das células binucleadas, podemos encontrar três alterações distintas. A primeira, como já mencionado, equivale aos MNs, os quais correspondem a fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não estão ligados ao fuso mitótico durante a divisão celular e acabam fora dos núcleos-filhos. As pontes nucleoplasmáticas, ou PNPs, por sua vez, ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são transferidos para polos opostos da célula na anáfase, sendo possível visualizar material nuclear unindo os dois núcleos-filhos. A análise de PNPs pode fornecer informações sobre o tipo de mutação envolvida (clastogênese ou aneugênese) quando comparada com a frequência de MNs, além de prover a medida de rearranjos cromossômicos. Por último, há os *buds* nucleares, que correspondem a amplificações de DNA encontradas na periferia nuclear (**Figura 17.1**).

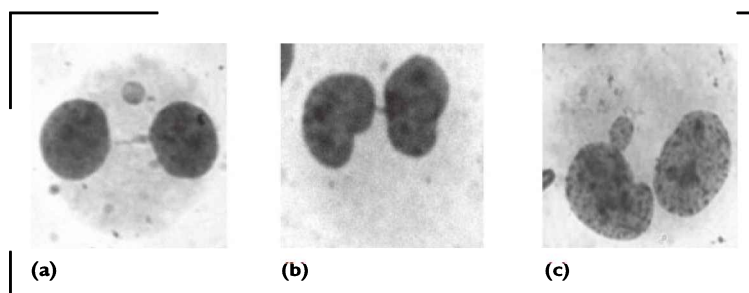
Utilizando a técnica de CBMN, é possível medir a frequência de quebra e perda cromossômicas (MN), rearranjos cromossômicos (PNP) e amplificação gênica (*bud*). Além desses parâmetros, é possível avaliar necrose e apoptose, bem como estimar efeitos citostáticos através dos intervalos de células mono, bi e multinucleadas (**Figura 17.2**).<sup>10</sup> A perda cromossômica pode ser diferenciada da que-

bra por sondas pancentroméricas ou anticorpos anticinetócoro. Em adição, as não disjunções (segregações anormais dos cromossomos entre os dois núcleos da célula binucleada) também podem ser avaliadas em células binucleadas utilizando-se sondas centroméricas específicas.

## Micronúcleos

Os MNs são formados a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que foram perdidos na anáfase, durante a divisão celular. Os MNs originados pela perda de cromossomos inteiros são primariamente formados por falha no fuso acromático, no cinetócoro ou em outras partes do aparato mitótico, ou por dano às subestruturas cromossômicas, alterações na fisiologia celular e alterações mecânicas. Alguns MNs podem derivar também de quebras de PNPs durante a anáfase. A frequência de MNs é aumentada pela exposição a agentes clastogênicos e aneugênicos e em células que demonstram instabilidade genômica.<sup>5-9</sup>

O conteúdo e a origem dos MNs podem ser acessados através de sondas de DNA centromérico. Desta maneira, MNs com centrômero negativo são induzidos por clastogênese e representam os fragmentos acêntricos. Já os MNs com centrômero positivo são produzidos por aneugênese, e considera-se que abriguem cromossomos inteiros. Em linfócitos de humanos, o balanço entre esses dois tipos básicos de MNs depende da idade e do sexo do indivíduo, sendo que MNs de centrômero negativo são mais frequentes em amostras de homens jovens, enquanto que MNs de centrômero positivo são mais frequentes em mulheres mais velhas. Os efeitos da idade e do sexo



**Figura 17.1**

(a) Linfócito binucleado com micronúcleo; (b) Linfócito binucleado com ponte nucleoplasmática; e (c) Linfócito binucleado com *bud* nuclear.

estão primariamente relacionados à micronucleação dos cromossomos sexuais.

Além dessas duas possíveis origens (fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiros), foi sugerido que os MNs podem adicionalmente ser gerados pelo processo de formação de *bud*, na intérfase,<sup>11</sup> o que será explicado posteriormente.

## Pontes nucleoplasmáticas

As PNPs ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para polos opostos da célula durante a anáfase (**Figura 17.3**).<sup>12</sup> Sem a utilização da citocalasina B a célula avança pela anáfase e telófase rapidamente, completando a citocinese e, por fim, rompendo a PNP com a separação das células-filhas. Entretanto, na técnica de CBMN, as células binucleadas com PNPs podem ser acumuladas, já que a citocinese é inibida. Assim, após a formação de membrana nuclear em torno dos cromossomos, a observação das PNPs é possível.<sup>13</sup>

Uma das vantagens da análise de PNPs é a possibilidade de avaliar eventos de quebra/translocação sem a necessidade de utilizar marcadores de cinetócoro ou centrômero,

permitindo uma visão mais complexa do possível dano cromossômico.

Cromossomos, cromátides e anéis dicêntricos podem se distribuir na anáfase de diferentes formas, dependendo do tracionamento de seus centrômeros. Quando esse tracionamento conduz cada centrômero para um polo oposto da célula, é possível a formação de uma PNP, o que, em teoria, deveria acompanhar a formação de um fragmento acêntrico capaz de originar um MN.

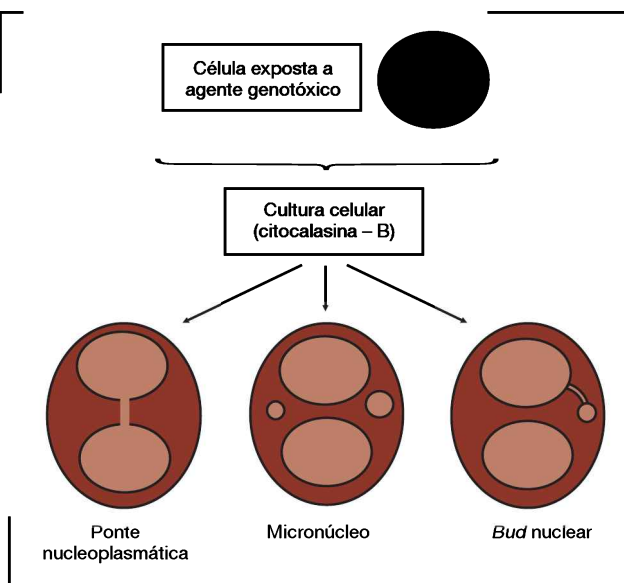
O valor de PNPs é positivamente correlacionado com a frequência de MNs, sendo que a relação PNP/MN confere uma importante ferramenta na distinção de efeitos tóxicos de diferentes agentes. Por exemplo, a indução de MNs na ausência de PNPs pode ser indicativa de um agente aneugênico, pois o MN não seria resultado de uma quebra, a qual poderia gerar uma PNP, e sim de um evento de perda cromossômica em função de falha no fuso acromático. Por outro lado, a presença de PNP seria indício de um agente clastogênico, como a radiação ionizante, por exemplo.

Um mecanismo alternativo para a formação de PNP refere-se à fusão de porções terminais de cromátides que sofreram encurtamento telomérico. Nesse caso, as PNPs não precisam necessariamente acompanhar a for-

**Figura 17.2**

Ilustração das possíveis consequências de culturas feitas pelo ensaio CBMN após exposição a agentes citotóxicos/genotóxicos. Utilizando esses biomarcadores, é possível avaliar a frequência de quebra cromossômica (MN), a perda cromossômica (MN) e o rearranjo cromossômico. Exemplo: cromossomos dicêntricos (NPB), amplificação genética (*buds*).

Fonte: Adaptada de Fenech.<sup>10</sup>



mação de um fragmento acêntrico. Em experimentos com roedores e humanos com câncer intestinal, foi possível observar uma correlação, favorecendo o uso de PNP na avaliação de encurtamentos críticos de telômeros.<sup>5</sup> Esse mecanismo justifica os casos de PNP com ausência de MN, os quais são bastante frequentes. Se as quebras ocorrerem em regiões teloméricas ou subteloméricas, é provável que ocorram perdas muito pequenas de cromatina, as quais não são visualizadas na microscopia sob forma de MN.

Outra aplicação para as PNPs corresponde à identificação de patologias de reparo de DNA, como a mutação no gene *BRCA1*, pois ela é capaz de avaliar a redução da capacidade de reparo via rearranjos cromossômicos. Essa avaliação pode ser realizada após testes de exposição a agentes genotóxicos, como a radiação ionizante e os oxidantes.<sup>12</sup>

## Buds nucleares

Os *buds* são morfologicamente similares aos MNs, com a exceção da conexão nucleoplasmática que os liga ao núcleo, a qual pode ser espessa ou fina, dependendo do estágio de formação do *bud*. Eles são observados em células humanas normais, entretanto aparentam ser mais raros do que os MNs em diversos tipos celulares.

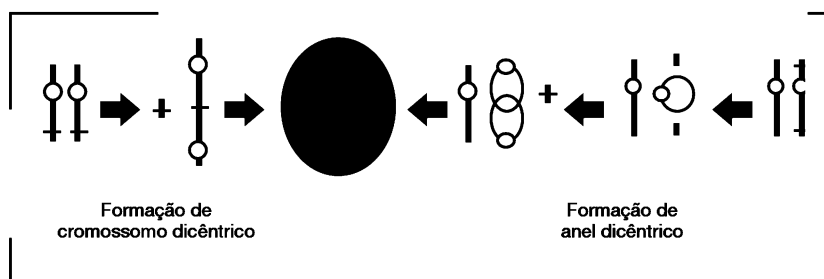
A formação de *buds* foi primeiramente observada em culturas celulares com condições

seletivas de crescimento, o que induz a amplificação gênica. Inibidores da síntese de DNA, como hidroxureia, demonstraram aumentar o intervalo de eliminação de DNA amplificado pela formação de *buds*.<sup>5,13</sup> Acredita-se que a amplificação gênica corresponda a um evento importante na resistência celular a drogas e na progressão tumoral.<sup>10</sup>

## Modelos para justificar a formação de MNs, *buds* e PNPs, bem como a relação entre essas estruturas

As alterações nucleares encontradas na CBMN não apresentam mecanismos de formação totalmente distintos, tampouco únicos. Atualmente discute-se a elaboração de modelos capazes de ilustrar a formação dessas estruturas e a interação existente entre elas, especialmente a relação entre *buds* e MNs.

A presença de MNs originados a partir de cromossomos inteiros é um fenômeno bem estabelecido, o qual aumenta com a idade e a deficiência de folato. Entretanto, a evidência de que cromossomos inteiros estejam envolvidos na formação de *buds* ainda é limitada. É plausível que a presença de um cromossomo extra desencadeie um mecanismo de reparo via aneuploidia, onde o cromossomo em excesso é eliminado como *buds*. Entretanto, essa hipótese ainda precisa ser testada.<sup>14</sup>



**Figura 17.3**

Formação de cromossomos e anéis dicêntricos, resultando na formação de PNP e MN entre os núcleos das células binucleadas. Fonte: Adaptada de Thomas e colaboradores.<sup>12</sup>

## Modelo de Shimizu e colaboradores:<sup>15</sup> amplificação gênica via ciclos quebra-fusão-ponte

Diversos modelos plausíveis para justificar a amplificação gênica foram propostos,<sup>16,17</sup> entretanto a presença de PNP na CBMN forneceu suporte para o modelo de ciclo de amplificação gênica via quebra-fusão-ponte (BFB, de *breakage-fusion-bridge*), descrito por McClintocks, em 1942 (**Figura 17.4**).<sup>18</sup>

Nesse modelo, cromátides-irmãs que passaram por quebras de fita dupla sofrem uma fusão nas porções distais, formando um cromossomo dicêntrico com duas cópias de genes homólogos entre os dois centrômeros. Durante a anáfase, os cromossomos dicêntricos podem ter seus centrômeros tracionados para polos opostos da célula, dando origem às PNP. Na citocinese posterior, a PNP é inevitavelmente quebrada, podendo formar um cromossomo com duas ou mais cópias de um ou mais genes, e outro cromossomo com deleções. As cromátides com cópias múltiplas

de genes podem fundar novamente durante a intérfase, formando um novo cromossomo dicêntrico (dobrando novamente o número de cópias de genes no cromossomo), o qual é então replicado na próxima divisão nuclear, formando um novo ciclo BFB e promovendo a amplificação gênica.

Complementando o modelo de BFB, Shimizu e colaboradores<sup>15,19</sup> sugerem que o DNA amplificado pode ser eliminado pela recombinação entre regiões homólogas com sequências amplificadas, formando minicírculos de DNA acêntrico e atelomérico (*double-minutes*), os quais são excluídos do núcleo subsequentemente, por um processo ativo que concentra o DNA amplificado em um ponto periférico do núcleo e o expulsa formando um *bud*. Esse *bud*, posteriormente, desconecta-se formando um MN na fase S do ciclo celular, até que eventualmente é excluído totalmente da célula pelo citoplasma, originando uma “minicélula”. Esse mecanismo sugere que o núcleo da célula pode ter a capacidade de perceber excessos de DNA que não se encaixam devidamente na matriz nuclear, enviando si-

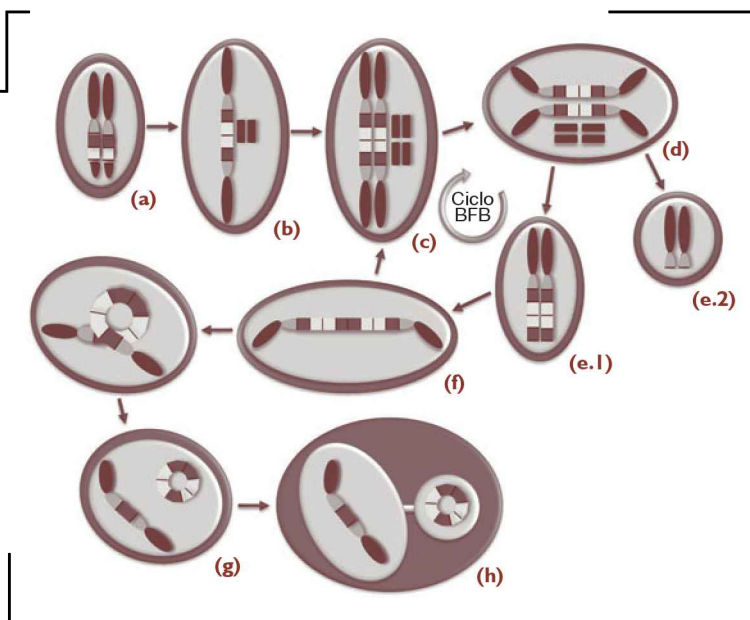
**Figura 17.4**

### Amplificação gênica via ciclos BFB.

Cromátides-irmãs quebradas (a) fusionam suas porções terminais formando um cromossomo dicêntrico (b). O cromossomo dicêntrico é replicado na fase S (c) e é tracionado para os polos celulares durante a anáfase (ponte) (d). Neste exemplo, o cromossomo dicêntrico quebra em uma região não central e uma célula-filha recebe cromossomos com duas cópias dos genes amarelo e vermelho (e.1), enquanto os cromossomos da outra célula apresentam deleção nesses genes (e.2).

Os cromossomos com cópias múltiplas podem sofrer uma nova fusão (f) e propagar o ciclo de amplificação (retorna para o ponto c). De maneira alternativa, uma recombinação pode ocorrer entre as sequências homólogas (g) e resultar em um fragmento acêntrico e circular de DNA ou *double-minute*, (h) o qual é subsequentemente excluído do núcleo via formação de *bud*.

Fonte: Adaptada de Fenech.<sup>10</sup>



nais para o reparo desse desequilíbrio. A duração desse processo de formação de *bud* com posterior extrusão do MN restante, entretanto, permanece desconhecida.<sup>20</sup>

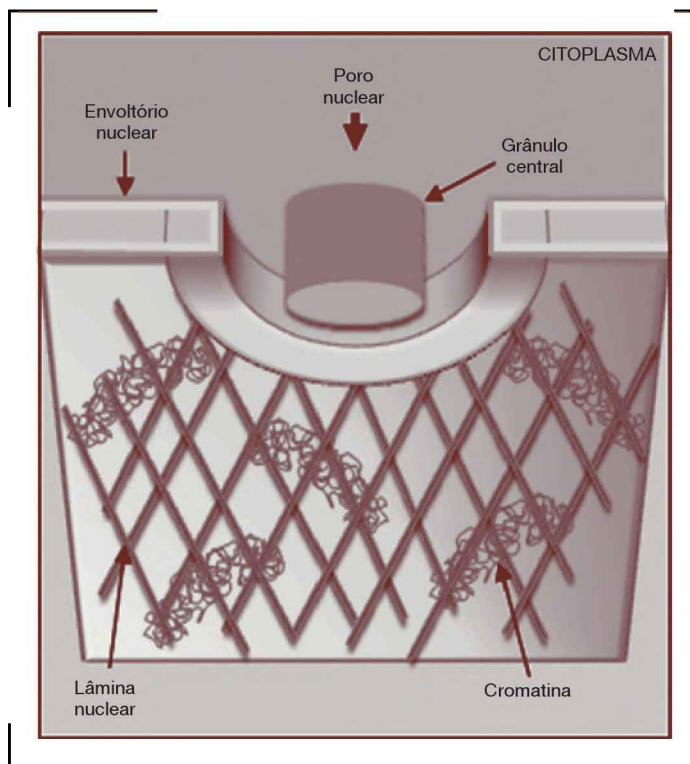
**Double-minutes:** estruturas extracromossômicas de DNA circular, consistindo de 1 a 2 milhões de pares de bases que replicam de maneira autônoma, aproximadamente uma vez por ciclo celular, e segregam ao acaso para as células-filhas, devido à ausência de centrômeros (para maiores detalhes, ver Capítulo 9).

## Modelo de Tanaka e Shimizu<sup>21</sup>

De acordo com Tanaka e Shimizu,<sup>21</sup> em um modelo de células de carcinoma colorrectal (COLO 320DM), *double-minutes* soltos no citoplasma poderiam constituir uma membrana própria, originando um MN ao final da mitose. Outros *double-minutes* amplificados que não atingiram as delimitações nucleares na divisão celular, por sua vez, poderiam ser

apanhados pelas proteínas da lâmina nuclear B (**Figura 17.5**), na fase S do ciclo celular. Posteriormente, durante a reconstituição da lâmina B e de todo envelope nuclear, haveria a formação de um *bud* nuclear. O DNA dessa estrutura ainda poderia ser replicado e, subsequentemente, liberado no citoplasma na forma de MN. Essas observações sugerem que os modelos interfásico e mitótico de formação de *buds* nucleares podem estar associados.

Os autores também sugerem que qualquer DNA citoplasmático, independente da sua origem, pode ser agregado e apanhado pela lâmina nuclear na fase S, gerando *buds* nucleares e MNs, os quais poderiam ser removidos da célula. Esse processo foi visto como um possível mecanismo universal pelo qual moléculas de DNA extracromossomal acêntricas são eliminadas das células, o que incluiria, além dos *double-minutes*, plasmídeos nucleares virais exógenos, DNA circular extracromossomal endógeno e DNA introduzido artificialmente.



**Figura 17.5**

A lâmina nuclear B, em conjunto com as lâminas A e C, forma um polímero complexo e multifuncional na periferia e no interior do envelope nuclear (lâmina nuclear), com função de estruturação do envelope nuclear e organização dos processos de transcrição, replicação e reparo de DNA.

## Modelo de Gisselsson e colaboradores<sup>22</sup>

Este modelo sugere a formação de *buds* nucleares e MNs a partir de PNPs rompidas na anáfase. Aparentemente, é um bom modelo para explicar a estrutura dos *buds* com pedículo, como se fosse o resultado de uma ponte quebrada. Entretanto, o fato de *buds* e MNs observados em células binucleadas serem, geralmente, solitários (ausência de *buds* complementares em núcleos opostos ou ausência de um MN associado, o qual representaria um fragmento da PNP) representa um argumento contrário a esse modelo. Contudo, se a PNP sofresse uma quebra na região de um dos cinetócoros, o resultado poderia ser uma única protuberância constituída pela PNP recolhida.

### Por que não é o modelo ideal?

- Não está claro com que frequência as PNPs quebram na anáfase pela técnica de CBMN.
- Evidências recentes indicam que a citocalasina B utilizada no teste reduziria a distância interpolar de modo que dificultaria a existência de uma tensão física suficiente para gerar a quebra de uma PNP.
- A ocorrência de *buds* contendo cromossomos inteiros, mesmo que em menor frequência, sugere que as PNPs (as quais se acredita que abriguem DNA intersticial) não sejam a única origem de *buds* nucleares. Esse argumento também contraria o envolvimento exclusivo de DNA amplificado na constituição dos *buds*.
- Supõe-se que sequências centroméricas e teloméricas sejam raras no caso de *buds* formados a partir de PNPs fragmentadas ou DNA amplificado originado pelo ciclo BFB. *Buds* com sequência telomérica podem representar projeções da parte distal de um dos braços de um cromossomo ou fragmentos terminais.<sup>11</sup>

## Modelo de Lindberg e colaboradores<sup>11</sup>

Com este modelo, é sugerido que o modelo de Tanaka e Shimizu<sup>21</sup> deve ser expandido,

para incluir qualquer DNA promíscuo, retardatários da anáfase e produtos de quebra de PNPs, incluindo fragmentos teloméricos, cromossomos inteiros e outros elementos cêntricos. Esse modelo combina as diferentes teorias sobre a formação de *buds* nucleares e as suas relações com os MNs, sugerindo um mecanismo geral para o desenvolvimento de *buds* nucleares no ciclo celular.

De acordo com esse modelo, qualquer DNA deixado no citoplasma durante a mitose ou é envolvido por uma membrana nuclear, formando diretamente um MN, ou é encapsulado posteriormente na fase S, durante a reconstituição do envelope nuclear, gerando um *bud*. O *bud*, por sua vez, pode se desprender do núcleo e originar um MN. Entretanto, ainda não fica clara a frequência em que *buds* nucleares originam MNs, tampouco a proporção de MNs formados por *buds*.

O envolvimento diferencial de DNA intersticial, fragmentos terminais e cromossomos inteiros na formação de *buds* e MNs pode estar associado a capacidades diferenciadas de interação com o envelope nuclear na telófase, para MNs serem formados ou expelidos do núcleo via formação de *buds*. Dessa forma, fragmentos intersticiais (anéis acêntricos) ou DNA promíscuo (p. ex., DNA amplificado, replicação falha ou condensação imprópria) sem telômeros e centrômeros podem ser pouco micronucleados e com maior tendência à formação de *buds*. De maneira similar, cromossomos inteiros e fragmentos terminais preferencialmente formariam MNs.

## Critérios para análise na técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese

No ano de 1997, foi criado o Projeto HUMN (*Human MicroNucleus*), que corresponde a um acordo de colaboração internacional entre mais de 40 laboratórios ao redor do mundo, os quais compartilham um grande interesse na aplicação da técnica de MNs como ferramenta de acesso aos efeitos ambientais sobre o dano cromossômico, tanto no sangue periférico como no tecido epitelial de populações humanas.



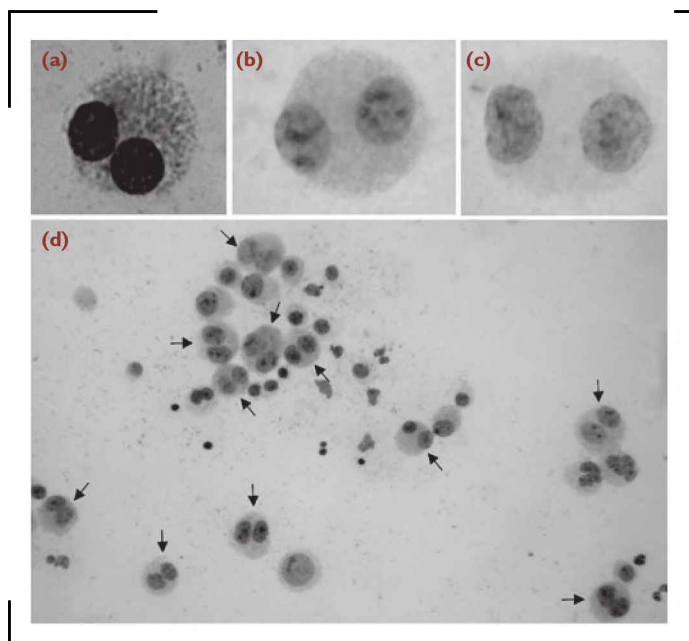
Os objetivos do Projeto HUMN são:

- Proporcionar uma comparação entre os principais métodos de cultura de linfócitos humanos e avaliar se tais métodos poderiam afetar as medidas de base da frequência de MNs. Esses resultados serão utilizados para estabelecer um procedimento internacional aceitável que permita a comparação dos resultados entre laboratórios e países.
- Comparar os resultados de diferentes laboratórios em relação às frequências de MNs encontradas. Esta comparação fornecerá informações a respeito da extensão da variabilidade de resultados “normais” entre diferentes laboratórios e países. Revelará também qual o nível de concordância entre eles a respeito da ação de algumas variáveis (como idade, sexo e hábito de fumar) sobre a frequência de MNs.
- Padronizar a preparação de lâminas e os critérios de análise.
- Proporcionar um estudo em perspectiva que liga os índices de MNs acumulados de cada laboratório, podendo assim determinar associações importantes entre certos padrões e doenças comuns, tais como câncer, envelhecimento e síndromes genéticas selecionadas.

A seguir, são descritas instruções detalhadas sobre os critérios de análise no ensaio CBMN de acordo com Fenech e colaboradores.<sup>23</sup>

## Critérios para a análise de células binucleadas (**Figura 17.6**)

- Os dois núcleos da célula binucleada devem estar situados no mesmo limite citoplasmático.
- As membranas nucleares devem estar intactas.
- Os tamanhos dos núcleos devem ser aproximados.
- O padrão e a intensidade da coloração dos núcleos devem ser iguais.
- Os núcleos da célula binucleada podem estar em contato, mas o ideal é não haver sobreposição. Uma célula com dois núcleos sobrepostos só pode ser considerada se os limites de cada núcleo forem distinguíveis.
- A membrana citoplasmática da célula deve estar intacta e deve ser claramente distinguível dos limites citoplasmáticos das células adjacentes.



**Figura 17.6**

Imagens de linfócitos binucleados típicos (a), (b), (c); exemplo de linfócitos binucleados viáveis para a análise de MNs (células indicadas pelas setas) (d).

## Critérios para a análise de micronúcleos (Figura 17.7)

- O diâmetro dos MNs geralmente varia entre  $1/16$  e  $1/3$  do diâmetro de um dos núcleos do linfócito binucleado, o que corresponde a uma variação de área de  $1/256$  a  $1/9$  em relação à área de um dos núcleos principais.
- MNs têm um formato redondo ou oval.
- MNs não são refringentes, o que os diferencia facilmente de alguns artefatos como partículas de corante.
- MNs não apresentam qualquer conexão com os núcleos principais.
- MNs podem encostar em um dos núcleos principais, mas não pode haver sobreposição, e os respectivos limites nucleares devem ser distinguíveis.
- MNs geralmente apresentam a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente essa intensidade pode ser maior.

## Critérios para a análise de PNPs (Figura 17.8)

- Os núcleos de uma célula binucleada podem estar conectados por uma PNP fina, que não deve ultrapassar a espessura de um quarto do diâmetro do núcleo maior.
- As PNPs podem não ser visualizadas adequadamente em células onde os núcleos estão em contato. Assim, é melhor restrin-

gir a análise de PNPs a células binucleadas com núcleos claramente separados.

- As PNPs devem apresentar o mesmo padrão de coloração dos núcleos da célula.
- Em raras ocasiões, mais de uma PNP pode ser visualizada na mesma célula binucleada.
- Uma célula binucleada com PNP pode ou não conter um ou mais MNs.

## Critérios para a análise de *buds* nucleares (Figura 17.9)

- *Buds* nucleares apresentam os mesmos critérios de análise dos MNs. A diferença é que essas estruturas estão conectadas a um dos núcleos principais do linfócito binucleado, ora através de uma estreita conexão nucleoplasmática, ora através de uma larga e evidente conexão.

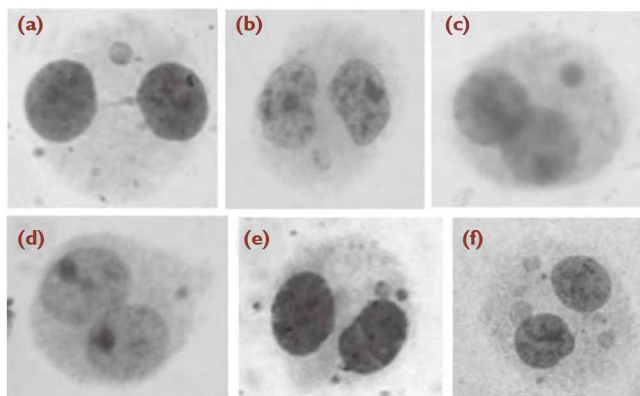
No ensaio de CBMN a partir de culturas de linfócitos humanos isolados, sem tratamento hipotônico, é possível avaliar outros dois parâmetros: células apoptóticas e células necróticas.

## Critérios para a avaliação de células apoptóticas

- Células apoptóticas iniciais podem ser identificadas pela condensação da cromatina dentro dos núcleos e pelos limites nucleares e citoplasmáticos, que devem estar intactos.

**Figura 17.7**

Imagens de linfócitos binucleados típicos com MNs (a), (b), (c), (d); linfócito binucleado com um MN e um *bud* (e); linfócito binucleado com diversos MNs, um *bud* e uma PNP rompida (f).





- Células em apoptose mais avançada já apresentam fragmentação nuclear, mas as membranas citoplasmáticas e nucleares ainda estão intactas.
- A intensidade de coloração dos núcleos, dos fragmentos nucleares e do citoplasma dessas células geralmente é maior do que a intensidade de células viáveis.

### CrITÉRIOS para a avaliação de células necróticas

- Células em necrose inicial podem ser identificadas pela presença de um citoplasma pálido com numerosos vacúolos (a maioria no citoplasma e alguns no núcleo). Além disso, a membrana citoplasmática apresenta-se danificada e o núcleo relativamente íntegro.
- Células em necrose mais avançada exibem perda de citoplasma e membrana nuclear danificada/irregular. A estrutura nuclear apresenta-se parcialmente intacta, e comumente há perda de material através da membrana nuclear.
- A intensidade de coloração dos núcleos e do citoplasma dessas células geralmente é menor do que a intensidade de células viáveis.

### Análise do índice de divisão nuclear (IDN)<sup>6</sup>

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{NT}$$

- M1 a M4: número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente.
- NT: número total de células viáveis.

### Análise do índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC)<sup>6</sup>

O IDNC é uma medida mais acurada que o IDN, pois, ao incluir as células apoptóticas e necróticas ao número total de células analisadas, permite considerar o efeito tóxico do agente testado.

$$\text{IDNC} = [\text{Apop} + \text{Necr} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{NT}$$

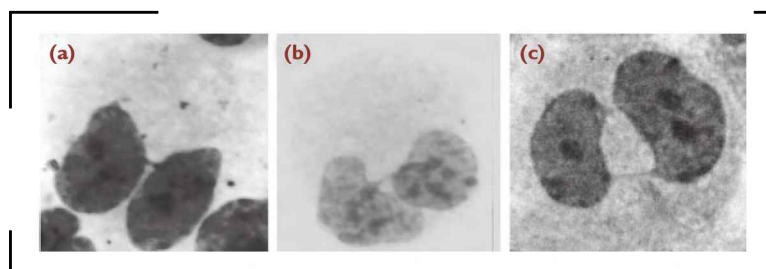
- Apop: número de células apoptóticas.
- Necr: número de células necróticas.
- M1 a M4: número de células viáveis com 1 a 4 núcleos.
- NT: número total de células analisadas (incluindo viáveis e inviáveis).

### Fatores que influenciam na frequência de micronúcleos

Alguns fatores não podem ser controlados nos estudos populacionais, mas devem ser levados em consideração durante a seleção de indivíduos-controle e durante a interpretação de resultados. Para isso, é preciso compreender como esses parâmetros podem atuar sobre a frequência de alterações no DNA.

### Idade

Tem sido demonstrado que a idade afeta significativamente a frequência da formação espontânea de MNs ou o dano de DNA em linfócitos de homens e mulheres. Anormalidades cromossômicas numéricas em geral surgem



**Figura 17.8**

Imagens de linfócitos binucleados típicos contendo PNPs (a), (b); linfócito binucleado com duas PNPs (c).

devido à não disjunção durante a meiose. Tanto células aneuploides em mitose como não disjunção em meiose aumentam com o avanço da idade. Alterações cromossômicas estruturais também apresentam correlação com a idade. O aumento de mutações com a idade também pode ser devido ao acúmulo de DNA lesado não reparado e/ou à diminuição da capacidade de reparar DNA. Com o avanço da idade, a proporção de células com falta de cromossomos X aumenta em mulheres, bem como a frequência de não disjunção meiótica. No homem, a incidência de não disjunção também pode aumentar com o avanço da idade, também já tendo sido demonstrada uma correlação positiva na expressão de MNs em linfócitos.<sup>24</sup>

## Gênero

O Grupo de Estudos Colaborativos para o Teste de Micronúcleos (*The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test*) demonstrou que existem diferenças entre os sexos quanto às frequências de MNs induzidas por algumas drogas em eritrócitos de camundongos. Estas diferenças são específicas, ou seja, cada droga testada se comporta de maneira diferente, dependendo de seus mecanismos de interação com o organismo.

O sexo é um fator que deve ser considerado na escolha dos indivíduos-controle, apesar de geralmente não haver diferença significativa quanto à frequência de aberrações cromossômicas. Em estudos onde as diferenças esperadas são pequenas, o pareamento dos controles deve respeitar o sexo.<sup>24</sup>

## Tabagismo

O hábito de fumar também pode alterar a frequência de mutações. Evidências epidemiológicas têm demonstrado claramente que o fumo está relacionado com carcinoma bron-

quial. Com respeito à indução de câncer de pulmão, pode ser observada uma relação dose-efeito entre o hábito de fumar e a incidência da doença. Extratos de cigarro demonstraram ter atividade de iniciadores de tumor em testes com roedores e em células humanas *in vitro*, e no teste de Ames são mutagênicos na presença de metabolizador preparado a partir de pulmão e fígado de mamíferos. Linfócitos de fumantes demonstraram um aumento significativo de cromossomos dicêntricos, anéis e trocas cromatídicas, indicando uma forte correlação com a atividade carcinogênica e mutagênica do cigarro. Também é observado um aumento na frequência de MNs, tanto em linfócitos B como em linfócitos T8 de fumantes, em relação aos controles.

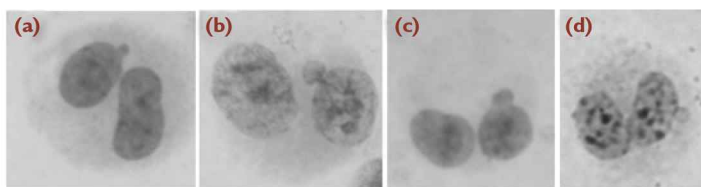
Normalmente, estudos de monitoramento incluem indivíduos fumantes e não fumantes. Em um determinado estudo, o hábito de fumar foi associado a um aumento no dano de DNA tanto em amostras de jovens como de adultos. De maneira complementar, também foi evidenciado maior dano de DNA em trabalhadores de fábricas de cigarro. Indivíduos que largaram o cigarro, por sua vez, demonstraram índices de dano de DNA inferiores no decorrer de um ano. Alguns estudos, entretanto, não encontraram nenhuma diferença entre fumantes e não fumantes em relação ao dano de DNA; outro estudo detectou ainda menor dano de DNA em indivíduos fumantes em relação a não fumantes. Contudo, esses resultados negativos podem estar relacionados com amostras pequenas que comprometeram o poder estatístico.<sup>25</sup>

## Dieta

A partir de investigações epidemiológicas, foi criada uma hipótese posteriormente confirmada em laboratório: altos níveis de gordura na dieta aumentam o risco de câncer de mama. Resultados de outros estudos epidemiológicos

**Figura 17.9**

**Imagens de linfócitos binucleados típicos com buds nucleares (a), (b), (c), (d).**



têm demonstrado correlação entre o consumo de gordura e a frequência de câncer em outros órgãos, particularmente na próstata e no colo.

Em 1978, o termo antimutagênico foi proposto, designando todos os fatores que agem diretamente sobre agentes mutagênicos ou em seus precursores, de modo a neutralizá-los. Diversos estudos têm investigado os efeitos de antioxidantes e nutrientes nos índices de dano de DNA. A vitamina C, por exemplo, em determinadas concentrações, reduz a frequência de trocas de cromátides-irmãs em linfócitos humanos do sangue periférico.

De acordo com um estudo de Fenech e colaboradores<sup>13</sup> em uma população de vegetarianos e não vegetarianos, com ampla variação nas concentrações de folato, vitamina B12, vitamina C e vitamina E no plasma, o folato e a vitamina B12 aparentemente são determinantes mais importantes da frequência de MNs do que as vitaminas C e E. Estudos subsequentes confirmaram as observações anteriores e, em adição, apontaram uma correlação significativa e positiva entre a frequência de MNs e os índices de homocisteína, um fator de risco para doenças cardiovasculares. Diversos micronutrientes como zinco, magnésio, ácido fólico e vitamina B12 são requeridos como cofatores no metabolismo do DNA. A deficiência desses cofatores poderia induzir mutações cromossômicas importantes que aumentariam o risco de câncer.

A hipótese de que determinada dieta pode reduzir a incidência de câncer em seres humanos foi primeiramente confirmada por análises epidemiológicas de grupos de populações de alto e baixo risco. Tais estudos demonstraram uma relação inversa entre consumo ou níveis séricos de vitamina A e risco de câncer. Mais especificamente, alguns estudos de-

monstraram que dietas ricas em carotenoides funcionam como fator de proteção. Dentre os carotenoides, uma atenção especial foi dada ao  $\beta$ -caroteno, um componente de capacidade antioxidante. Rosin<sup>26</sup> observou um decréscimo na frequência de MNs em células esfoliadas da cavidade oral e do trato geniturinário quando esses tecidos apresentavam maiores níveis de  $\beta$ -caroteno, sugerindo que populações de alto risco de câncer poderiam manter níveis de  $\beta$ -caroteno quimiopreventivos.

## Exercícios físicos

A atividade física excessiva geralmente é associada ao estresse oxidativo, podendo acarretar em altos níveis de dano de DNA oxidativo e peroxidação lipídica. Existem controvérsias a respeito de quando o estresse oxidativo está relacionado com um maior risco de desenvolvimento de doenças; portanto, os níveis de atividade física deveriam ser cuidadosamente analisados em estudos de biomonitoramento. Dano de DNA causado por exercício físico intenso pode ser detectado pelo ensaio cometa, mas não existe nenhuma evidência de aumento na frequência de aberrações cromossômicas ou MNs. Isso pode ser explicado pelo fato de que o ensaio cometa detecta o dano antes da ação do sistema de reparo, o que significa que o dano encontrado ainda pode ser reparado, enquanto que os ensaios de aberrações cromossômicas e MNs detectam dano de DNA que não pode ser reparado. Portanto, é possível inferir que a maior parte, ou talvez todo o dano produzido pelos exercícios físicos é reparado. De qualquer maneira, quando o organismo é repetidamente exposto a situações que podem danificar o DNA, a probabilidade de que algumas dessas alterações não sejam reparadas, ou sejam incorretamente reparadas, aumenta.<sup>25</sup>

## Referências

1. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999 Jul 16;428(1-2):271-83.
2. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976 Dec;41(2-3):321-32.
3. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985 Feb-Apr;147(1-2):29-36.
4. Carter SB. Effects of cytochalasin on mammalian cells. *Nature.* 1967 Jan 21;213(5073):261-4.
5. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.
6. Salvadori DMF, Ribeiro LR, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro.

- M. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editores. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA; 2003. p. 201-23.
7. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res*. 2000 Aug;463(2):111-72.
  8. Carrano AV, Natarajan AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*. 1988 Mar;204(3):379-406.
  9. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003 May;18(3):221-33.
  10. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006 Aug 30;600(1-2):58-66.
  11. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res*. 2007 Apr 1;617(1-2):33-45.
  12. Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*. 2003 Mar;18(2):187-94.
  13. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*. 2002 Jul 25;504(1-2):131-6.
  14. Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res*. 2004 Jul 13;551(1-2):167-80.
  15. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol*. 1998 Mar 23;140(6):1307-20.
  16. Windle BE, Wahl GM. Molecular dissection of mammalian gene amplification: new mechanistic insights revealed by analyses of very early events. *Mutat Res*. 1992 May;276(3):199-224.
  17. Stark GR. Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv Cancer Res*. 1993;61:87-113.
  18. McClintock B. The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1942 Nov;28(11):458-63.
  19. Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res*. 2000 Mar 14;448(1):81-90.
  20. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*. 2002 Nov 15;7(22):1128-37.
  21. Tanaka T, Shimizu N. Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G(1) and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. *J Cell Sci*. 2000 Feb;113 ( Pt 4):697-707.
  22. Gisselsson D, Björk J, Höglund M, Mertens F, Dal Cin P, Akerman M, et al. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):199-206.
  23. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E; HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003 Jan 10;534(1-2):65-75.
  24. Maluf SW, Erdtmann B. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance; 2003. p. 183-205.
  25. Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 2004 Sep;347(1-2):15-24.
  26. Rosin MP. Antigenotoxic activity of carotenoids in carcinogen-exposed populations. *Basic Life Sci*. 1990;52:45-59.

## Leituras recomendadas

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007 Mar;28(3):625-31.

Heddle JA. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):199-206.

Scaffidi P, Misteli T. Good news in the nuclear envelope: loss of lamin A might be a gain. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):632-4.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975 Feb;31(1):9-15.

Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosome damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 2000 May;15(3):261-9.

Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* 1996; 365(1-3):147-519.

# Ensaio cometa

## Introdução

A técnica do cometa, ou eletroforese em célula única, é um método rápido, sensível e de baixo custo para a avaliação de quebras de cadeias de DNA em células eucarióticas e para a investigação do dano genético associado a exposições a agentes potencialmente genotóxicos. Atualmente, essa técnica é utilizada como um método-padrão para a avaliação do dano de DNA em diversas áreas de aplicação, que incluem:

- biomonitoramento, em uma grande variedade de espécies e em sistemas *in vitro* e *in vivo*;
- avaliação do dano de DNA e do estresse oxidativo em relação a inúmeras doenças, assim como avaliação da proteção pela atuação de antioxidantes;
- genética toxicológica (*in vitro* e *in vivo*, em células humanas, de outros animais e de plantas);
- monitoramento ecológico e toxicologia aquática;
- uso como ferramenta na investigação do dano e do reparo de DNA em diferentes tipos celulares, em resposta a inúmeros agentes genotóxicos.

Outros exemplos incluem investigações de químicos industriais, farmacêuticos, biocidas, agroquímicos e químicos alimentares, como os aditivos. É um método que requer poucas células, possuindo vantagens como a realização em células não proliferativas e a avaliação a partir de células individuais de diferentes tecidos. Além disso, os resultados podem ser

obtidos dentro de horas. Entretanto, tal método não é muito utilizado como ferramenta analítica padrão em laboratórios clínicos, devido a algumas dúvidas que ainda existem sobre sua confiabilidade, reprodutibilidade e validade.<sup>1,2</sup>

Um grande número de modificações do ensaio cometa está sendo desenvolvido como, por exemplo, a avaliação de ligações cruzadas (*crosslinks*) e a investigação de reparo por excisão de bases (REB) e reparo por excisão nucleotídeos (REN).<sup>2</sup> A migração reduzida do DNA em relação ao controle negativo pode indicar indução de *crosslinks*, que são lesões relevantes no que diz respeito à mutagenese e que devem ser investigadas. Um aumento na migração do DNA indica indução de quebras de cadeias e/ou sítios álcali-lábeis. Além disso, o aumento da atividade de reparo por excisão pode resultar em um aumento na migração do DNA. Esse tipo de reparo pode influenciar os efeitos do ensaio cometa de uma maneira complexa. Enquanto o reparo de DNA geralmente reduz a migração por eliminar as lesões no DNA, o contínuo reparo por excisão pode aumentar a migração devido às quebras de cadeia de DNA relacionadas às incisões.<sup>3</sup>

Em 1984, Östling e Johanson<sup>4</sup> descreveram o comportamento do DNA em células isoladas sob a ação de um campo elétrico, detectando quebras induzidas por radiação ionizante. Nesse teste, foi utilizado um pH de 10, valor abaixo do requerido para o relaxamento das cadeias de DNA. Alguns anos depois, Singh e colaboradores<sup>5</sup> descreveram um método similar, porém sob condições mais alcalinas.

O período de tratamento alcalino permite a separação das cadeias de DNA. O relaxamento alcalino deve elevar o pH por um curto período de tempo, de modo que o DNA se torne par-

cialmente relaxado, sendo que a extensão da separação das cadeias vai depender da quantidade de quebras presentes. Já no método de eluição neutro (sem desnaturação), o índice de eluição do DNA depende da frequência de quebras de fita dupla, não sendo alterado por quebras de fita simples.<sup>6</sup> Além disso, nesse ensaio pode ser realizado um passo extra de digestão com endonucleases de lesão específica após a lise, permitindo a detecção quantitativa de bases danificadas: as bases oxidadas são as mais comumente avaliadas em estudos.<sup>1,3</sup>

A molécula de DNA é organizada em nucleossomos nas células vivas, sendo o enrolamento do DNA em volta do core de histonas que permite sua compactação. Após a lise em NaCl 2,5 M, grande parte das histonas é removida e a estrutura dos nucleossomos é afetada, porém o DNA continua condensado.<sup>6</sup> A subsequente incubação alcalina e a eletroforese fazem com que as alças de DNA que contenham quebras se movam em direção ao ânodo, formando a “cauda do cometa”, visível sob microscopia óptica ou de fluorescência, com o uso de métodos de coloração adequados. A quebra de fita simples pode gerar fragmentos que migram com a eletroforese ou relaxar a estrutura supercondensada na região de DNA que o dano ocorreu, permitindo a essa região, em forma de alça, se estender no campo eletroforético. As imagens obtidas assemelham-se a cometas, e o conteúdo relativo ao DNA na cauda indica a frequência de quebras, que podem ser originados a partir de quebras de fita simples, fita dupla ou sítios álcali-lábeis, onde se incluem os sítios apurínicos e apirimidínicos (sítios AP). Entretanto, as lesões primárias detectadas por esse ensaio podem ser corretamente reparadas, não gerando alterações genéticas permanentes.

Sob condições alcalinas, o relaxamento das duas cadeias de DNA ocorre, o que pode gerar diferenças em detalhes da cauda do cometa de ensaios neutros e de ensaios alcalinos. O DNA da cauda de um cometa alcalino aparenta ser granular, se houver fragmentos de DNA presentes. Contudo, o fator essencial que determina se um segmento de DNA é observado na cauda do cometa ao invés da cabeça do cometa é o relaxamento do DNA supercondensado, o qual depende de quebras e ocorre independentemente do pH. Dessa forma, com o aumento dos níveis de dano, é a intensidade relativa da

coloração do DNA na cauda que aumenta, ao invés do comprimento da cauda – inteiramente consistente com o aumento do número de alças de DNA tornando-se relaxadas.<sup>6</sup>

Como visto anteriormente, o dano de DNA consiste principalmente de lesões transitórias. O dano avaliado representa um estado dinâmico regular, com um balanço entre a fixação e a remoção (reparo) do dano. O ensaio cometa gera uma mistura de lesões, como quebras de fita simples e fita dupla, sítios AP e intermediários de reparo, assim como, em células proliferativas, quebras associadas à replicação.<sup>1</sup> Acredita-se que existam duas influências gerais na atividade de reparo do DNA: uma genética, relacionada a polimorfismos, e a outra ambiental, em um amplo sentido (incluindo exposições, dieta e outros hábitos de vida).<sup>7</sup>

A partir de agora, iniciaremos uma revisão abrangente sobre o ensaio cometa, com informações sobre diversas questões e fatores envolvidos na realização e aplicabilidade dessa técnica, além de alguns dados que buscam auxiliar no entendimento de sua significância biológica. Concluindo este capítulo, apresentamos a descrição da técnica do cometa em pH alcalino.

## Apoptose

A avaliação de processos apoptóticos pelo ensaio cometa não é aceita pela totalidade dos pesquisadores. Alguns autores descrevem que a probabilidade de detecção dos fragmentos de DNA provenientes de apoptose pelo ensaio cometa é mínima. Para eles, a apoptose não é uma consequência imediata a um insulto celular severo, levando tempo para ser desenvolvida e, além disso, os danos que ocorrem na apoptose, por definição, são irreversíveis, enquanto que os danos avaliados no ensaio cometa são reparáveis. Porém, em casos de análises de células durante várias horas após um tratamento indutor de apoptose, as quebras de cadeias reveladas no ensaio cometa poderiam ser representativas de estágios iniciais da apoptose. Alguns estudos descrevem que células necróticas ou apoptóticas podem resultar em cometas com cabeças pequenas ou inexistentes e caudas largas e difusas, comumente descritas como cometa ouriço (*hedgehogs*),

“células-fantasma”, “nuvens” ou “núcleo celular não detectável”. O ensaio cometa *in vitro* demonstra que essas células podem ser visualizadas após tratamento com agentes citotóxicos e não genotóxicos. Entretanto, tais imagens microscópicas também podem ser detectadas após tratamento com altas doses de radiação ou altas concentrações de fortes agentes mutagênicos, não sendo, portanto, diagnóstico único para apoptose/necrose.<sup>3</sup>

## Linfócitos

Os leucócitos são, de modo geral, as únicas células válidas para biomonitoramento, e há muitas vantagens sobre isso: são facilmente obtidos em grande número, não requerem cultura celular, são células diploides e quase todos estão na mesma fase do ciclo celular ( $G_0$ ). Os linfócitos podem ser isolados por centrifugação com uma solução que contém diatrizoato de sódio e polissacarídeo, ou uma preparação similar, a fim de reter os linfócitos enquanto outras células brancas e eritrócitos passam através dessa camada.<sup>6</sup>

Os estados celular, nuclear e metabólico dos linfócitos (incluindo o DNA) podem refletir o estado geral do organismo, à medida que eles circulam através de todo o corpo humano ou animal. Entretanto, é importante levar em consideração que, para se obter o nível de dano de um órgão em particular (com seu metabolismo específico), os linfócitos talvez possam não servir. Uma limitação adicional dos linfócitos é a questão da sobrevivência muito limitada *in vitro*, a menos que estimulados por mitógenos, como a fitoemaglutinina. Além disso, por possuírem variação fenotípica de indivíduo para indivíduo, alguns autores acham que sua utilização pode não ser tão adequada, levando ao uso de linhagens celulares de padrão permanente para muitas propostas experimentais.<sup>6</sup>

O congelamento de linfócitos recentemente isolados não aumenta os níveis endógenos de dano de DNA. Há um protocolo de congelamento lento dos linfócitos, feito em meio de cultura celular MEM (*minimal essential medium*) ou meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) com 10% de soro bovino fetal e 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO), mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Além desse protocolo, há outro para

congelamento do sangue total, onde a amostra é misturada com um volume igual de meio contendo 20% de DMSO e estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Não foram observadas diferenças nas quebras das cadeias de DNA entre amostras de sangue congeladas e frescas.<sup>1</sup>

## DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAMt) possui um tamanho de 16.569 pb ou  $11 \times 10^6$  Da, ou seja, é muito menor do que os fragmentos de DNA que compõem a cauda do cometa. Além disso, o DNAMt não está associado de forma alguma à matriz nuclear, sendo simplesmente muito pequeno para ser detectado por essa técnica.<sup>6</sup>

## Células-alvo e substitutas

Uma das maiores aplicações do ensaio cometa é a avaliação da genotoxicidade local no primeiro sítio de contato do tecido para compostos com fraco sistema de bioavaliabilidade e para compostos de curta existência (ou seus metabólitos). A avaliação dos efeitos genotóxicos em órgãos expostos diretamente pode orientar certos cenários de exposições humanas.<sup>3</sup>

Como visto anteriormente, as células de escolha para amostragem em estudos de biomonitoramento são, frequentemente, os linfócitos (ou leucócitos). Porém, devemos lembrar que os leucócitos não são representativos de todas as células do corpo. Células mais apropriadas de outros tecidos e órgãos podem ser válidas em algumas situações. Células esfoliadas da bexiga, células epiteliais da mucosa oral e nasal, células epiteliais do ducto lacrimal e células oriundas de biópsias vêm sendo utilizadas, porém “bons cometas” (com níveis baixos razoáveis de dano) podem não ser obtidos, especialmente quando o tecido precisa ser desagregado ou quando muitas células mortas ou senescentes estão presentes.<sup>1</sup>

## Reparo de DNA

Diferenças individuais na capacidade de reparo estão vinculadas à suscetibilidade ao

câncer, fazendo do reparo de DNA um importante marcador em estudos de biomonitoramento. Uma baixa capacidade de reparo pode sugerir um nível de dano estável relativamente elevado ou implicar em uma falta de indução, devido a níveis baixos de dano. A maneira mais simples de medir o reparo de DNA em células humanas é por meio da avaliação da cinética do reparo das quebras de DNA ou de sítios sensíveis a enzimas durante a incubação das células após o tratamento com agentes indutores de danos específicos.<sup>1</sup>

Em estudos que envolvem o reparo de DNA, há várias vias de reparo, que incluem o reparo de quebras de cadeia simples e o REB, sendo que ambos podem ser estudados com o uso do ensaio cometa. O reparo de quebras de cadeia simples, que se aplica à reincorporação do DNA nos pontos de quebra induzidos por radiação ionizante ou agentes como o  $H_2O_2$ , é um processo rápido na maioria das linhagens celulares normais (tempo médio de aproximadamente 10 minutos); porém, em linfócitos recentemente isolados, esse processo pode durar várias horas. A explicação para esse fato é que, imediatamente após o isolamento, os linfócitos sofrem danos oxidativos devido à exposição repentina à alta concentração de  $O_2$  na atmosfera (comparada ao sangue), sendo que a aparente demora no reparo de quebras induzidas por  $H_2O_2$  é parcialmente contabilizada pelo dano oxidativo contínuo e pelas quebras de cadeia adicionais, enquanto o sistema de reparo age.<sup>6,7</sup>

Devido a essas incertezas, foi proposta uma nova abordagem *in vitro*. Um simples extrato de células totais é preparado a partir de linfócitos, por meio de congelamento-descongelamento e lise com Triton X-100. O substrato da reação consiste em nucleoides embebidos em agarose contendo um excesso de um tipo particular de dano de DNA. Na primeira versão desse teste, o substrato era primeiramente tratado com Ro 19-8022 com exposição à luz para induzir 8-oxoGua antes da inclusão em agarose. A incubação do substrato com o extrato resulta na produção de quebras de cadeia no substrato de DNA, refletindo a capacidade das células de realizarem o passo inicial de reparo das bases oxidadas. Esse parâmetro de capacidade de reparo tem sido utilizado em estudos de biomonitoramento e, recentemente, esse método foi modificado para a avaliação da capacidade do

REN, com a utilização de um substrato de DNA danificado por diol-epóxido benzo[a]pireno ou nucleoides de células pré-tratadas com UV.<sup>6</sup>

De qualquer forma, como o reparo de DNA pode ser utilizado como um biomarcador válido em estudos populacionais, essas ainda são questões de contínua investigação e discussão.

## Endonucleases de lesão específica e estresse oxidativo

O ensaio cometa é capaz de detectar quebras de cadeias de DNA e sítios álcali-lábeis, os quais incluem os sítios AP, que surgem pela perda de uma base danificada, levando à redução de uma base nitrogenada na estrutura do nucleotídeo. Os sítios AP ocorrem como intermediários durante o REB, podendo também surgir espontaneamente devido a alterações na estabilidade química, resultantes de mudanças nas bases ou açúcares. O uso de  $pH > 13$  (que corresponde a 0,3 M de NaOH no protocolo usual do ensaio cometa) é suficientemente capaz de converter sítios AP em quebras; porém, um  $pH$  próximo de 12 (que corresponde a 0,03 M de NaOH) não é capaz de permitir essa conversão. Entretanto, ainda não é bem estabelecido que uma incubação de 40 minutos em 0,3 M de NaOH é realmente suficiente para converter todos os sítios AP, ou mesmo qual é o nível basal dos sítios AP, que provavelmente possuam variação entre os diferentes tipos celulares.<sup>6</sup>

As quebras de cadeias e os sítios AP não são os únicos tipos de dano em células normais: as bases oxidadas também podem estar presentes. Bases de DNA oxidadas são indicativas do estado redox geral do organismo, podendo atuar como um marcador independente, útil em estudos de doenças crônicas, como doenças vasculares e o diabetes. O ensaio cometa, portanto, atua como um biomarcador na avaliação dos efeitos do estresse oxidativo ou da proteção antioxidante em humanos, a partir da análise dos produtos de oxidação do DNA.<sup>1</sup>

Bases oxidadas podem ser detectadas pelo ensaio cometa por meio da incorporação de um passo adicional na técnica: após a lise das



células embebidas em agarose, o DNA é digerido com endonucleases de lesão específica, aumentando a sensibilidade e a especificidade do ensaio cometa.<sup>6</sup> As especificidades variadas das enzimas de reparo fazem delas ferramentas muito úteis na análise do espectro de dano induzido nas células pela exposição a um agente genotóxico. Essas enzimas estão envolvidas no reparo do DNA, além de possuírem atividade específica contra certas lesões, introduzindo uma quebra nos sítios onde há uma base danificada.<sup>1</sup>

O requerimento de substratos e a habilidade de clivar adutos específicos podem ser diferentes *in vitro* e *in vivo*. Controles positivos tratados devem ser preparados cuidadosamente para serem adequados ao estudo, a fim de produzir apenas as lesões de interesse. Para a certificação de que as lesões de interesse estão quantitativamente detectadas, e de que as quebras inespecíficas não estão ocorrendo, as condições ótimas de reação (para cada lote de enzima) precisam ser estabelecidas por titulação, variando a concentração da enzima e/ou o tempo de incubação.<sup>6</sup>

## Eletroforese

Como regra geral para a performance da eletroforese no ensaio cometa, utiliza-se uma voltagem fixa de 25 V, e normalmente uma corrente de 300 mA, a qual é ajustada pelo volume total do tampão de eletroforese. O ajuste da quantidade de tampão na cuba de eletroforese pode variar de uma fina camada a alguns milímetros dessa solução acima da plataforma, onde as lâminas ficam acomodadas para a eletroforese. Qualquer variação na profundidade do tampão ao longo da superfície da cuba pode resultar em efeitos significativos na voltagem, na temperatura local e no pH.

Na realidade, a voltagem total aplicada e também a corrente são, em teoria, irrelevantes, já que a voltagem através do gel (V/cm na plataforma) é a força motriz para a eletroforese da molécula de DNA. Uma corrente maior, portanto, é preferível, desde que a fonte de alimentação possa fornecer essa energia. Com isso, o parâmetro que deve ser especificado na descrição das condições de eletroforese é a V/cm através da plataforma.

## Avaliação dos cometas

Um importante parâmetro no caso do ensaio cometa é o escore médio de cada amostra. Ao menos dois géis replicados são necessários para a obtenção do valor médio da amostra, e esses valores médios são utilizados nas análises estatísticas, enquanto que a escolha do teste estatístico mais adequado depende da distribuição dos dados (distribuição normal ou não).

Atualmente, existem diferentes abordagens para a avaliação dos cometas. São elas:

- medição do comprimento da cauda do cometa por microfotografia, que fornece informações limitadas, como o aumento do comprimento da cauda somente a níveis baixos de dano – e que logo se tornam máximos – reduzindo, dessa maneira, a escala útil do ensaio;
- classificação dos cometas por inspeção visual, tipicamente em cinco classes: o (zero) representa células sem dano (cometas sem cauda ou com caudas pouco detectáveis), e de 1 a 4 representam um aumento relativo na intensidade das caudas. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 núcleos analisados resulta no valor individual, que pode variar, dessa forma, de 0 a 400 unidades arbitrárias (**Figura 18.1**);
- análise de imagens, através de uma câmera acoplada a um computador com *software* apropriado, disponível comercialmente ou via internet. As imagens dos cometas são, então, selecionadas pelo operador;
- sistemas automatizados, os quais procuram os cometas e realizam a análise com mínima intervenção humana.

A avaliação visual dos cometas tem sido correlacionada à análise de imagens por computador, e o resultado demonstrou que há uma boa – porém não perfeitamente linear – correlação entre a classificação visual e os parâmetros de análise de imagens (relativos à intensidade da cauda ou ao momento da cauda), e a calibração com base em radiação pode ser aplicada a cometas classificados visualmente, tal como a análise de imagens por computador.

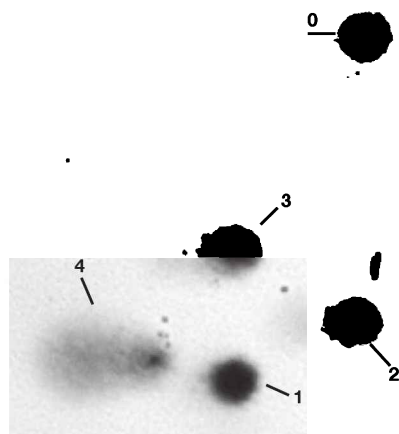
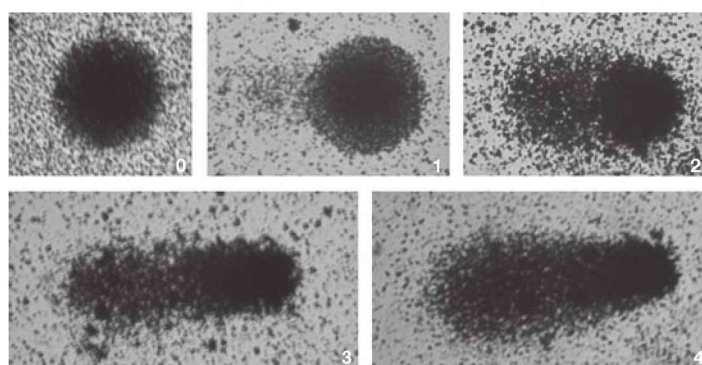
O ensaio cometa possui uma faixa dinâmica limitada, saturando quando a maior parte do DNA está na cauda. Isso se torna um problema com o uso de endonucleases de lesão específica para medir danos adicionais de bases, pois o resultado total de dano pode se aproximar do limite de saturação, e os resultados finais referentes aos sítios sensíveis à enzima possivelmente sejam subestimados, a menos que a calibração do ensaio tenha sido realizada com muito cuidado.<sup>6</sup> Quanto à coloração, vários tipos de corantes são utilizados para a visualização dos cometas. Brometo de etídio e DAPI são os fluorocromos mais comumente utilizados. Há também diversas colorações alternativas, como iodeto de propídio, YOYO-1<sup>TM</sup>, SybrGold<sup>TM</sup>, SybrGreen<sup>TM</sup>, TOTO<sup>TM</sup> e prata (para coloração não fluorescente).<sup>6</sup>

## Calibração

É muito útil e informativo se os resultados do cometa, obtidos como porcentagem do DNA na cauda ou como unidades arbitrárias, possam ser expressos em unidades "reais", tais como quebras de DNA por  $10^9$  Da. Isso depende da calibração do ensaio cometa, que pode ser realizada pela medida do dano de células expostas a uma faixa de doses de radiação ionizante.<sup>1</sup> Assim, os resultados podem ser expressos em equivalentes Gy. A faixa de dano detectada com o ensaio cometa é de cerca de 0,2 a 10 equivalentes Gy, ou 0,06 a 3 quebras por  $10^9$  Da. Com isso, cerca de cem a milhares de quebras por célula humana podem ser detectadas. Isso, convenientemente, engloba um

**Figura 18.1**

**Classes do cometa:** os diferentes escores (de 0 a 4) são atribuídos de acordo com o formato da cabeça e da cauda (DNA migrado).



nível de dano plausível encontrado em células controle como um valor basal normal, assim como o dano que é infligido experimentalmente, sem ocasionar morte celular.<sup>6</sup>

---

## Cuidados para a garantia da confiabilidade do ensaio

Os passos referentes à técnica, desde a obtenção da amostra até a avaliação final dos dados, influenciam na confiabilidade dos resultados. Cada laboratório deve estabelecer e implantar procedimentos-padrão para todos os experimentos, para a manipulação das amostras e para as análises. Como sabemos que os laboratórios não realizam seus estudos a partir de protocolos idênticos, estudos de validação interlaboratórios continuam sendo práticas importantes a serem adotadas.

É recomendado que as amostras sejam processadas o mais rápido possível, a fim de evitar níveis alterados de dano associados ao tempo de armazenamento. Quanto maior o tempo entre a coleta das amostras e o processamento, maior poderá ser o declínio dos níveis de dano devido à ação do sistema de reparo e/ou à perda de células extremamente danificadas. Além disso, pode ocorrer um aumento nos níveis de dano de DNA associado às condições de armazenamento.<sup>8</sup> Lesões primárias de curta duração, como as quebras de fita simples (que podem sofrer rápido reparo), podem ser perdidas. A refrigeração das amostras a 8°C ou menos, além do processamento entre 2 a 6 horas após a coleta, minimiza a perda dos danos de DNA e possivelmente garante que essas lesões sejam capturadas pelo ensaio cometa (**Quadro 18.1**).<sup>3</sup>

---

## Fatores associados à genotoxicidade

Devido à grande sensibilidade do ensaio cometa, alguns fatores devem ser levados em consideração. Esses fatores incluem consumo de álcool, dieta, inúmeras doenças crônicas, infecções, exercício físico, sexo, idade e tabagismo.<sup>9</sup> Ainda não está claro se os níveis basais de dano de DNA diferem entre homens e mulheres, assim como o efeito do hábito

de fumar, que possui resultados conflitantes pelo ensaio cometa em inúmeros estudos. Entretanto, alguns autores apontam que níveis de fumo maiores que 20 a 30 cigarros/dia aparentam ser relevantes para os índices de genotoxicidade detectados pelo ensaio cometa.<sup>10</sup> No caso da idade, os resultados também variam, porém o envelhecimento está associado a um leve aumento nos níveis de bases oxidadas/quebras de cadeias. Além disso, o ambiente de moradia (rural *versus* urbano) parece influenciar nos níveis de dano e no reparo subsequente.<sup>1</sup>

---

## Interação gene-ambiente

Há um crescente interesse em investigar polimorfismos e suas influências no fenótipo. Diversos estudos de biomonitoramento incluem marcadores genéticos (*single nucleotide polymorphisms*) como biomarcadores de suscetibilidade individual para avaliação da modulação dos efeitos de exposição sobre os níveis de dano de DNA e de reparo, já que as respostas aos fatores ambientais frequentemente dependem de polimorfismos genéticos específicos. Sabemos que é praticamente impossível a análise de todos os polimorfismos genéticos. Porém, dependendo da exposição, da população de estudo e dos fatores de confusão, ao menos os polimorfismos mais relevantes devem ser levados em consideração. Como exemplos, temos os polimorfismos em genes de reparo, como os genes *XPA*, *XPB*, *XPG*, *XPC*, *XRCC1* e *XRCC3*, e nos genes da glutatona-S-transferase (GST), que são enzimas importantes para o controle do estresse oxidativo e que parecem influenciar na estabilidade do DNA e nos efeitos genotóxicos de exposição por outros mecanismos, exercendo uma provável função protetora contra danos oxidativos de DNA.<sup>4,7</sup>

---

## Infertilidade masculina e reprodução assistida

Na espermogênese, as protaminas (que possuem a metade do tamanho das histonas) substituem a maioria das histonas, e a cromatina é enrolada dentro de estruturas únicas supercondensadas com formato de *donuts*,

denominadas toroides. Quando o esperma passa pelo epidídimo, as protaminas sofrem ligações cruzadas dissulfídicas, reduzindo a cromatina para um sexto do seu volume.

No uso do ensaio cometa em pH alcalino, a real quantidade de danos de um esperma pode ser medida. Como esse método requer apenas 100 células por análise, isso tem facilitado os estudos que envolvem a análise do DNA de esperma testicular e, também de homens com baixa concentração de esperma (baixo número de espermatozoides). Para a otimização do uso do ensaio cometa em amostras de esperma, foi

determinado que a percentagem do DNA na cauda é o parâmetro de maior reprodutibilidade para a classificação dos cometas.

Limiares clínicos para o sucesso em tratamentos de reprodução assistida ainda não foram estabelecidos para o ensaio cometa em pH alcalino; entretanto, o seu valor clínico tem sido demonstrado em diagnósticos de perfis de sêmen subótimos e, também, em associações com parâmetros clássicos da análise de sêmen, como concentração do esperma, morfologia, função mitocondrial e penetração no oócito.<sup>11</sup>

#### QUADRO 18.1

##### Descrição da técnica (amostra utilizada: sangue total)

A técnica de eletroforese em célula única com pH alcalino ou ensaio cometa em pH alcalino deve ser realizada sob ausência de luz direta, para que não ocorra indução de dano de DNA. As lâminas são preparadas com a adição de 300 µL de solução de agarose regular sobre cada lâmina microscópica, a qual solidifica a 4°C, durante 5 a 30 minutos. Uma mistura composta de 5 µL de sangue total com 95 µL de agarose *low-melting* 0,7% é adicionada à lâmina e, em seguida, uma laminula é colocada sobre a lâmina. As lâminas são acomodadas em um recipiente e mantidas em geladeira por cinco minutos, até a camada de agarose solidificar. Após esse tempo, a laminula é delicadamente retirada da lâmina, sendo esta colocada em uma solução de lise gelada e recém-preparada, composta por NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10,2, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO. Depois de 1 a 24 horas a 4°C, as lâminas são gentilmente removidas da solução de lise. Elas são acomodadas em uma cuba horizontal resfriada a 4°C e submersas em tampão de eletroforese recentemente preparado (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13), ficando em espera durante 20 minutos. Ao término do tempo estabelecido, a fonte é ligada. A eletroforese ocorre a 25 V e 300 mA (~0,95 V/cm), durante 20 minutos. Com o término da eletroforese, as lâminas são delicadamente removidas da cuba, e adiciona-se tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) três vezes, durante cinco minutos cada. Em seguida, as lâminas são lavadas três vezes com água destilada, e posteriormente deixadas secando ao ar por, no mínimo, 24 horas. O DNA pode ser corado de diferentes maneiras, como visto anteriormente, e para a avaliação e a classificação dos danos de DNA, 100 células por lâmina são analisadas individualmente em um microscópio, em aumento de 400x. Para avaliação dos cometas, sugerimos o método de classificação visual (já descrito anteriormente), onde o zero representa células sem dano (cometas sem cauda ou com caudas pouco detectáveis), e de 1 a 4 representam um aumento relativo na intensidade das caudas. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 cometas resulta no valor individual, que pode variar, dessa forma, de 0 a 400 unidades arbitrárias.

Fonte: Adaptado de Tice e colaboradores.<sup>12</sup>

## Referências

1. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):191-205.
2. Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):171-82.
3. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005 Jul;20(4):245-54.
4. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8.
5. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels

- of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91.
6. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):143-51.
  7. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*. 2009 Jan-Feb;681(1):24-32.
  8. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res*. 2000 Aug;463(2):111-72.
  9. Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 2004 Sep;347(1-2):15-24.
  10. Battershill JM, Burnett K, Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*. 2008 Nov;23(6):423-37.
  11. Lewis SE, Agbaje IM. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):163-70.
  12. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.

Maria de Lourdes L. F. Chauffaille

# Diagnóstico citogenético da leucemia mieloide crônica

## Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal, que se origina de célula progenitora multipotente que adquiriu mutação genética. Ela encaixa-se no grupo de doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC) da classificação da OMS.<sup>1</sup>

A LMC é uma doença bi ou trifásica. A fase inicial é chamada de fase crônica (FC). O paciente queixa-se de fraqueza, cansaço, indisposição, dor abdominal, aumento de volume do abdome ou empachamento após as refeições devido ao aumento do tamanho do baço. Cerca de 30 a 40% dos pacientes são diagnosticados em exames de rotina, enquanto 75% têm esplenomegalia no exame físico. Antes da era de medicamentos antitirocinaquinase, a FC durava em média quatro anos.

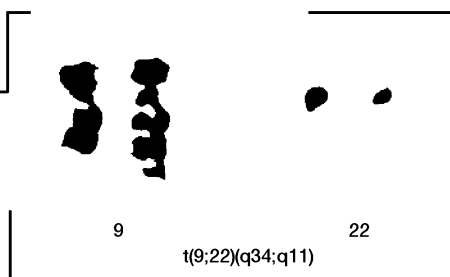
A LMC evolui espontaneamente para fases avançadas: crise blástica (CB) com ou sem uma fase intermediária, denominada fase acelerada (FA). Nestes estágios avançados, as

células não conseguem se diferenciar e há predominio de blastos (linfóides ou mielóides). Neste momento, os pacientes, em geral, são sintomáticos com febre, dor óssea, sangramento e sudorese.

A FA precede a CB em 2 a 15 meses, e esta última se parece superficialmente com uma leucemia aguda *de novo*. Quando comparada com a FA, a CB é mais fácil de definir, já que os critérios são os mesmos de leucemia aguda ou há infiltração de blastos em órgãos ou tecidos.

A fisiopatologia da LMC se baseia na presença do cromossomo Philadelphia (Ph), uma anormalidade citogenética adquirida, ou seja, a  $t(9;22)(q34;q11)$  (**Figura 19.1**), formando o rearranjo gênico BCR-ABL. O gene da fusão BCR-ABL1 transcreve RNAm, que codifica uma proteína com atividade tirosina-quinase maior que a proteína produzida pelo ABL “selvagem”. Dependendo do ponto de quebra no BCR, o produto da fusão pode ser: M-BCR (*major*), m-BCR (*minor*) ou  $\mu$ BCR. O M-BCR é o mais comum na LMC, e resulta em proteína de 210 kD ( $p210^{BCR-ABL}$ ). O m-BCR, que

**Figura 19.1**  
Translocação entre os cromossomos 9 e 22, típica da LMC.



codifica a p190<sup>BCR-ABL</sup>, ocorre em dois terços das leucemias linfócitas agudas, sendo menos frequente na LMC. O  $\mu$ BCR codifica uma proteína de 230 kD, bem mais rara.

Ativação constitutiva da sinalização mitogênica, redução da apoptose e redução da adesão das células ao estroma e à matriz extracelular são as possíveis ações da proteína BCR-ABL1 na fisiopatologia da LMC.

Cerca de 95% dos pacientes com LMC apresentam a translocação entre os cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11.2)], resultando no cromossomo Ph. O cariótipo da medula óssea é o método de escolha para tal detecção porque permite a avaliação de todos os cromossomos e a identificação de alterações adicionais, cromossomo Ph variante simples ou complexo.

O cromossomo Ph variante ocorre entre 5 e 10% dos casos e pode ser simples ou complexo. Os simples é aquele no qual está envolvido outro cromossomo além do 9 e do 22, por exemplo, t(9;22;6),<sup>2</sup> e o complexo conta com a participação de pelo menos dois outros cromossomos, por exemplo, t(1;9;22;11).<sup>3</sup> O cromossomo Ph variante pode ter sido formado concomitantemente ao evento biológico que originou t(9;22), na forma de um rearranjo simples com quebra simultânea de vários cromossomos seguida por fusão cruzada, ou pode ser fruto de dois eventos sucessivos – o primeiro, no qual se deu t(9;22), e um subsequente, que envolveu outros dois cromossomos e originou a forma complexa.<sup>4,5</sup>

Além disso, cerca de 50% dos cromossomos Ph variantes podem apresentar deleção adicional de regiões nos cromossomos 9 ou 22, a montante do ponto de quebra habitual, detectada por meio de hibridização *in situ* por fluorescência.

A presença do cromossomo Ph clássico com alterações adicionais representa < 5% dos casos e, dependendo da alteração, pode significar tanto evolução clonal como alteração constitucional.

A detecção de evolução clonal apresenta correspondência clínica com progressão da doença para FA ou CB, se caracterizando pelo aparecimento de alterações cromossômicas adicionais ao cromossomo Ph, mais frequentemente representadas por trissomia 8, aquisição de um segundo cromossomo Ph (duplo Ph) isocromossomo do braço longo do

17, trissomia 19 e trissomia 21, entre outras.<sup>6</sup> A evolução clonal pode estar presente em 7% dos casos de LMC ao diagnóstico, embora o mais frequente seja a ocorrência em fase mais tardia, no decorrer da progressão da doença, sendo detectável pelo cariótipo meses antes de outras manifestações clínicas ou hematológicas. A evolução clonal pode ser observada em 42% dos casos em FA e em 80% dos pacientes em CB. Isto é, na CB, 75 a 80% dos pacientes apresentam as alterações cromossômicas adicionais descritas anteriormente.

A ausência do cromossomo Ph em caso clinicamente compatível com LMC suscita a investigação da presença do rearranjo BCR/ABL1 por métodos moleculares, tais como FISH ou PCR, já que o rearranjo pode estar presente na ausência de alteração cromossômica. Em especial, esse fenômeno pode ser observado quando essas células não entram em divisão e, por conseguinte, o clone não pode ser detectado pelo método citogenético. Tal situação ocorre em < 5% dos casos, sendo denominada “cromossomo Ph mascarado”. O comportamento evolutivo desses pacientes é igual àqueles Ph-positivos.

Na presença de outras anomalias cromossômicas diferentes do Ph, também deve-se conferir a presença do rearranjo BCR/ABL por outros métodos. Caso o rearranjo esteja de fato ausente, a alteração cromossômica é indicativa de doença clonal e, nesses casos, considera-se a doença como LMC atípica.

Diante do fato de a LMC apresentar o cromossomo Ph, foi possível o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como as drogas inibidoras da tirosina-quinase (TK). Essa modalidade de medicamento proporciona a remissão hematológica, citogenética e molecular, o que tornou necessário o monitoramento adequado dos pacientes para a demonstração da eficácia do tratamento, o controle da resistência/recaída ou a introdução de medidas alternativas no caso de falha terapêutica.

Estabeleceu-se como 20 o número mínimo de metáfases para a análise do cariótipo, pois se trata de amostragem suficiente para afastar mosaicismos maior que 14% com intervalo de confiança de 95%, ou ainda detectar a presença de subclones.<sup>7,8</sup>

A resposta citogenética é graduada conforme a porcentagem de células Ph-positivas



residuais na medula óssea, a saber: resposta mínima, quando houver de 66 a 95% de células Ph-positivas; resposta menor, com 36 a 65%; resposta parcial, com 1 a 35%, e resposta completa, com ausência do cromossomo Ph (**Tabela 19.1**). As respostas completa e parcial também são interpretadas como resposta maior.

Cerca de 40% dos pacientes em uso de droga antitirosina-quinase (mesilato de imatinibe) apresentarão resposta citogenética maior em seis meses, e 65% alcançarão remissão citogenética completa em um ano de tratamento.<sup>9</sup>

Raros pacientes em uso de medicamento antitirosina-quinase podem apresentar alterações cromossômicas clonais nas células Ph-negativas,<sup>10</sup> tais como +8, -7q e -Y. Em alguns casos, as anormalidades observadas são transitórias, enquanto em outras elas persistem ou aumentam de proporção com o tempo. Aparentemente, tais alterações não predis põem à transformação para síndrome mielodisplásica ou leucemia aguda e tampouco são consequência do tratamento direto com mesilato de imatinibe. Essas alterações podem, entretanto, refletir instabilidade genômica em uma população de células que precedeu a aquisição do cromossomo Ph e, com a supressão do clone Ph, essa população torna-se evidente, podendo também corresponder a uma resposta anormal ao estresse consequente da restauração da hematopoiese Ph-negativa e, presumivelmente, normal. A primeira hipótese torna-se mais convincente à luz da noção de que a neoplasia é um evento de múltiplos passos e o cromossomo Ph seria o fenômeno tardio que determinaria o estabelecimento clínico da LMC e o controle da evolução da doença. Nesse contexto, a redução ou a eliminação do clone Ph permitiria que a

célula progenitora se expandisse, adquirindo nova anomalia cromossômica com potencial de escape ao controle da droga. Há estudos que demonstram que o percentual de células Ph-negativas é inversamente proporcional ao clone Ph-positivo, sugerindo a coexistência de duas populações celulares.<sup>11</sup>

Citogenética molecular: hibridização *in situ* por fluorescência

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é um método que utiliza sonda (sequência de DNA) complementar ao alvo que se pretende analisar. Essa técnica pode ser usada para detectar o rearranjo BCR/ABL1 ao diagnóstico, e tem sido preconizada para as situações em que não se têm metáfases para análise ou de cromossomo Ph mascarado no cariótipo. Pela rapidez do teste, pode também ser usado em situações específicas.

A primeira geração de sondas (fusão simples) permitia a visualização de um sinal correspondente ao ABL (vermelho) e outro ao BCR (verde). O rearranjo BCR/ABL1 era detectado quando havia a união de dois sinais, um verde e um vermelho, conferindo uma cor amarelada, além da presença de mais um sinal verde e um vermelho isolados, correspondentes aos cromossomos homólogos 9 e 22, normais (**Figura 19.2a**). Entretanto, como podia haver justaposição geográfica de sinais, sugerindo falsa fusão, o valor de normalidade variava conforme a qualidade técnica e a destreza instaladas em cada laboratório.

A segunda geração de sondas foi confeccionada para contornar esse problema e exibia

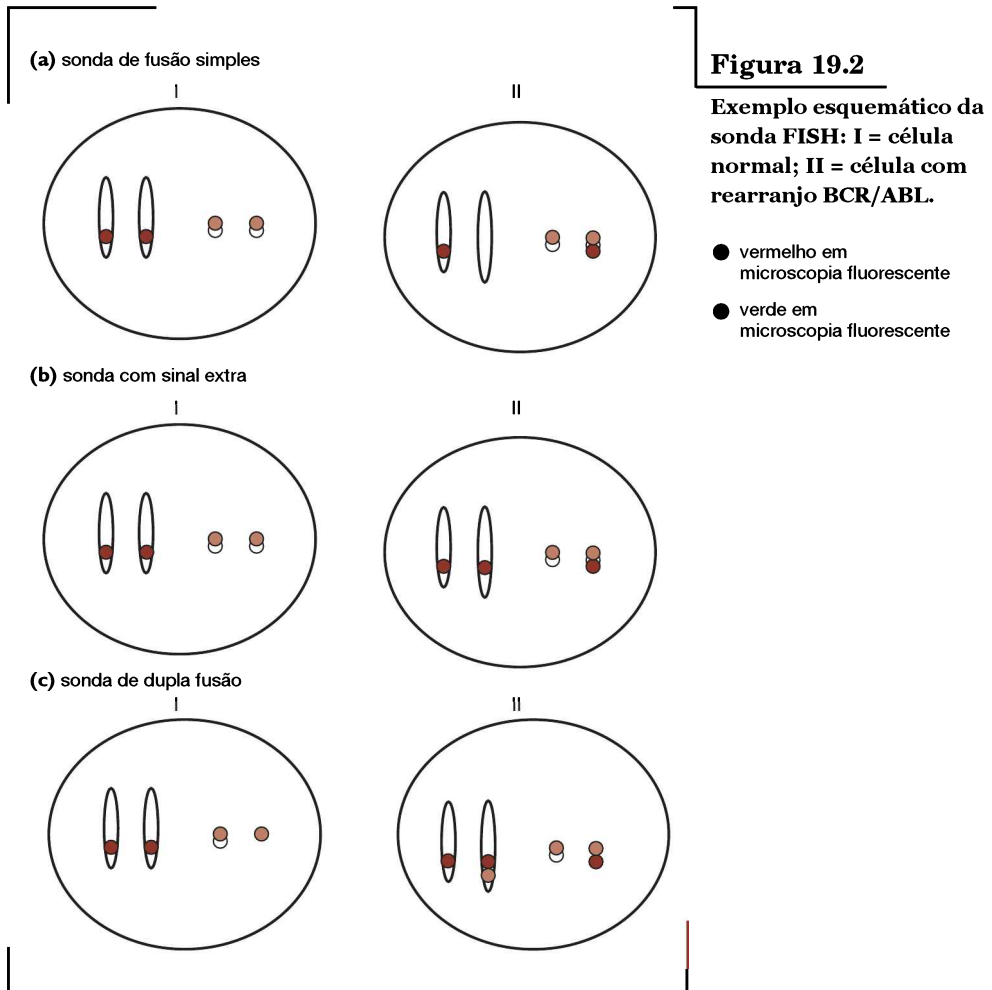
TABELA 19.1  
Graduação da resposta citogenética

Tipo de resposta	Porcentagem de células Ph-positivas	
Completa	Ausência	Resposta maior
Parcial	1 a 35%	
Menor	36 a 65%	
Mínima	66 a 95%	
Sem resposta	> 95%	



um sinal vermelho extra no braço longo do cromossomo 9 envolvido na translocação. Nesse modelo, a célula com rearranjo apresentava, além do sinal de fusão e dos sinais vermelho e verde isolados dos homólogos normais, um sinal extra vermelho, correspondente ao alelo 9 translocado (**Figura 19.2b**). Já a terceira geração de sondas, conhecida como de dupla fusão, apresenta sinais extras tanto no derivado 9q como no 22q, aumentando a sensibilidade e a especificidade do método, mas, fundamentalmente, permitindo a detecção de deleções adicionais em ambos os cromossomos (**Figura 19.2c**). Graças ao uso dessas sondas de segunda e terceira geração, diversas situações anormais com perda do sinal extra ou de dupla fusão puderam ser detectadas.<sup>12</sup>

Cerca de 9 a 33% dos casos de LMC têm deleção der(9q), fato que confere sobrevida significativamente mais curta que aqueles casos sem tal deleção. Um estudo realizado em 120 pacientes com LMC Ph<sup>+</sup>/BCR/ABL<sup>+</sup> atendidos no ambulatório de Leucemias da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP revelou a presença de deleção em der(9q) ou del 5' ABL em 15% dos casos. Esses pacientes apresentaram sobrevida global (27 *versus* 61 meses,  $p = 0,02$ ) e duração da FC (17 *versus* 56 meses,  $p = 0,02$ ) significativamente menores que os pacientes sem a deleção.<sup>12</sup> O mecanismo implicado para explicar a gravidade da doença nesses casos de deleção der(q) seria a perda de um ou mais genes supressores tumorais na região da deleção que induziria a



agressividade por evento secundário ou por haploinsuficiência. Conforme anteriormente exposto, tais casos merecem atenção dedicada tanto para a dose terapêutica como para o controle de tratamento.

O método de FISH tem sido utilizado no diagnóstico adjutorialmente ao cariótipo, para detecção da deleção do derivado 9q. Depois disso, pode ser usado no monitoramento precoce, aos três e seis meses de tra-

tamento, como alternativa ao cariótipo da medula óssea, uma vez que pode ser feito em amostra de sangue periférico. Após a remissão citogenético-molecular, cabe o monitoramento com PCR em tempo real por sua maior sensibilidade. A FISH volta a ter papel destacado na FA, na CB ou na fase de resistência ao tratamento, quando pode evidenciar reaparecimento do rearranjo ou mesmo mais de uma cópia por ocasião da amplificação da fusão gênica.

## Referências

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Chauffaille MLLF, Perroud PR, Catelani ALM, Obelar MRE, Kusagari N, Abe KT. LMC com cromossomo Philadelphia-variante: relato de três casos. *NewsLab*. 1999;7(37): 58-60.
3. Babicka L, Zemanova Z, Pavlistova L, Brezinova J, Ransdorfova S, Houskova L, et al. Complex chromosomal rearrangements in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Jul 1;168(1):22-9.
4. Fitzgerald PH, Morris CM. Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet Cytogenet*. 1991 Dec;57(2):143-51.
5. Nacheva E, Holloway T, Brown K, Bloxham D, Green AR. Philadelphia-negative chronic myeloid leukaemia: detection by FISH of BCR-ABL fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 22. *Br J Haematol*. 1994 Jun;87(2):409-12.
6. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1995.
7. Haferlach C, Rieder H, Lillington DM, Dastugue N, Hagemeijer A, et al. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 May;46(5):494-9.
8. Richardson AM. Chromosome analysis. In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck J, editors. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Raven, 1997.p. 481-526.
9. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809-20.
10. Abruzzese E, Gozzetti A, Galimberti S, Trawinska M M, Caravita T, Siniscalchi A, et al. Characterization of Ph negative abnormal clones emerging during imatinib therapy. *Cancer*. 2007 Jun 15;109(12):2466-72.
11. Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, Dufva IH, Brøndum-Nielsen K. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1390-3.
12. Vaz de Campos MG, Montesano FT, Rodrigues MM, Chauffaille Mde L. Clinical implications of der(9q) deletions detected through dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007 Oct 1;178(1):49-56.

# Diagnóstico citogenético da leucemia mieloide aguda

## Introdução

A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação de mieloblastos anormais. Exposição a benzeno, radiação ionizante e tratamento com agentes alquilantes ou outras drogas citotóxicas podem causar LMA. Ela ocorre mais habitualmente em indivíduos adultos, e sua frequência aumenta com a idade, até que, acima dos 45 anos, corresponde a 90 a 95% do total de leucemias agudas.

## Diagnóstico

O diagnóstico é feito por análise do hemograma, mielograma, imunofenotipagem, estudo cromossômico dos blastos (cariótipo) e análises moleculares.

A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) considera como critério diagnóstico de LMA a infiltração da medula óssea (MO) por 20% ou mais de mieloblastos, levando em consideração os aspectos genéticos e moleculares, além de história prévia de mielodisplasia (**Tabela 20.1**). Daí a razão de, além de examinar morfollogicamente os mieloblastos, proceder-se à imunofenotipagem e à análise citogenética e molecular.

## Imunofenotipagem

A citometria de fluxo permite identificar a diferenciação mieloide (mieloblastos não expressam marcadores linfoides, imunoglobulina de membrana ou de citoplasma) em aproxi-

madamente 98% dos casos. Para isso, deve-se usar uma bateria de anticorpos que assegure a distinção entre os subtipos de leucemias. Além disso, o uso de múltiplos marcadores ajuda a identificar fenótipos associados a determinadas anomalias citogenéticas, fenótipos aberrantes que podem auxiliar na detecção de doença residual pós-terapia ou situações raras como as leucemias bifenóticas ou de duas linhagens.

O painel de anticorpos monoclonais (AcMo) deve conter marcadores dos precursores hematopoiéticos (CD34, HLA-DR, Tdt e CD45), linhagem B (CD19, CD20, CD22 e CD79a), linhagem T (CD2, CD3, Cd5 e CD7), mieloide (CD13, CD33, CD15, MPO e CD117) e megacarioblástica (CD41 e CD61).

## Citogenética

O estudo das alterações cromossômicas deve ser feito ao diagnóstico para se prover a melhor classificação da LMA, a escolha terapêutica, o prognóstico, a eventual detecção de doença residual posterior, a recaída ou a evolução clonal. Cerca de 75% das LMAs apresentam alterações de cariótipo, podendo ser numéricas ou estruturais.

Graças aos estudos citogenéticos intensivamente realizados em LMA foi possível dividir as alterações em subgrupos de risco, sendo eles favorável, intermediário e desfavorável ou desconhecido (**Tabela 20.2**).

Pela sua importância e por suas características, as alterações t(8;21), t(15;17), inv(16) e 11q23 estão comentadas na classificação da OMS. A **Figura 20.1** mostra alguns exemplos descritos a seguir.

- LMA com t(8;21)(q22;q22) ou ETO/AML (CBF $\alpha$ ):  
A t(8;21) é detectada em 5 a 12% dos casos de LMA. O produto da translocação é o gene de fusão AML1-ETO (RUNX1/RUNXT1). O AML1 é um fator de trans-

crição pertencente à família CBF (*core binding factor*), que é um complexo transcrricional envolvido na diferenciação da célula progenitora hematopoiética. Esta leucemia está associada à resposta favorável ao tratamento quimioterápico, particular-

**TABELA 20.1**  
Classificação da OMS de leucemia mieloide aguda

Classificação	
LMA com translocações balanceadas/inversões	LMA com t(8;21)(q22;q22) ou RUNX1/RUNXT1 LMA com t(15;17)(q22;q11-12) e variantes ou PML/RARA LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), CBF $\alpha$ /MYH11 LMA com t(9;11)(p22;q23) ou MLLT3/MLL LMA com t(6;9)(p23;q34) ou DEK/NUP214 LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ou RPN1/EVI1 LMA megacarioblástica com t(1;22)(p13;q13) ou RBM15/MKL1
LMA com mutações gênicas	KIT FLT3-duplicação interna em tandem (ITD) FLT3-domínio tirosina-quinase (TKD) MLL-duplicação parcial em tandem (PTD) CEBPA NPM1 WT1 BAALC ERG MN1
LMA com displasia de múltiplas linhagens	Pós síndrome mielodisplásica (SMD) ou doença mieloproliferativa Sem antecedentes
LMA/SMD associada a tratamento	LMA/SMD associada a agentes alquilantes LMA/SMD associada a inibidores da topoisomerase II
LMA não categorizada nos itens anteriores	LMA com diferenciação mínima LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monoblástica e monocítica aguda Leucemia eritroide aguda Leucemia megariocítica aguda Leucemia basofílica aguda Pan-mielose com mielofibrose aguda Sarcoma mieloide
Sarcoma mieloide	

mente quando se utiliza alta dose de AraC na intensificação. Fatores que alteram o bom prognóstico incluem idade (pior em crianças), leucometria inicial elevada, presença de CD56 e del(9q) associada ou doença extramedular.

- Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17)(q22;q11-12) e variantes ou PML/RARA:

A LPA representa 5 a 18% das LMAs, ocorre em qualquer faixa etária e está associada à coagulação intravascular disseminada (CIVD). O gene RARA (15q22) é translocado e fundido com um dos seguintes genes: PML, PLZF, NPM, NuMA ou STAT5b (15q22, 11q23, 5q35 e 11q11, respectivamente). Os genes híbridos resultantes (genes X-RARA) codificam paraproteínas de fusão (X-RARA) que exercem atividade dominante negativa na via dos retinoides e na via da proteína X. Os complexos repressores formados não respondem a doses fisiológicas de ácido retinoico (ação diferenciadora), e a repressão gênica incessante leva a bloqueio da diferenciação mieloide, desregulação do ciclo celular e vantagem proliferativa, culminando na transforma-

ção leucêmica. A administração de doses farmacológicas de ácido transretinoico (ATRA) leva à dissociação deste complexo, recruta ativadores e causa a diferenciação da célula leucêmica. As LPAs com t(11;17)/PLZF-RARA são resistentes ao ATRA.

- Leucemia mielomonoblástica aguda com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), CBFα/MYH11:

Este subtipo representa 10 a 12% das LMAs e se caracteriza por infiltração mielomonocítica da medula, além de eosinófilos anormais. A fusão do gene CBFβ e do gene para a cadeia pesada da miosina do músculo liso (MYH11) resulta no sequestro de grande quantidade de proteína CBFβ no citoplasma, excluindo-a do núcleo e, portanto, inativando funcionalmente a CBFα/β. Esta leucemia apresenta maior taxa de remissão completa e prognóstico relativamente favorável.

- Leucemia monoblástica aguda com 11q23 (MLL):

Ela representa 5 a 6% dos casos de LMA e ocorre em qualquer faixa etária, sendo comum em lactentes ou após tratamento

**TABELA 20.2**  
Categorias de risco citogenético para leucemia mieloide aguda

Cariótipo	Grupo SWOG	Grupo MRC
Favorável	t(8;21) com ou sem del(9q) e com ou sem complexidade com mais de três alterações, t(15;17) com ou sem alterações adicionais, inv(16)/ t(16;16)/del(16q) com ou sem alterações adicionais	t(8;21) com ou sem anormalidade
Intermediário	Normal, +6, +8, -Y, del 12(p)	Anormalidade de 11q23, del(9q), del(7q) sem outras anormalidades, cariótipos complexos (mais de três anormalidades e menos de cinco), todas as outras anormalidades de prognóstico desconhecido
Desfavorável	-5/del(5q), -7/del(7q), inv(3q)/t(3;3), t(6;9), del(9q), t(9;22), 11q anormal, 20q, 21q, ou 17p ou cariótipo complexo definido com mais de três alterações	Cariótipo complexo com mais de cinco anormalidades
Desconhecido	Todas as outras anormalidades	

SWOG, Southwestern Oncology Group; MRC, Medical Research Council  
Fonte: Adaptada de Grimwade e colaboradores<sup>1</sup> e Slovak e colaboradores.<sup>2</sup>

quimioterápico, especialmente com inibidores da topoisomerase, e havendo associação com os tipos monocítico e mielo-monocítico. Está associada a prognóstico desfavorável.

## Técnicas moleculares

**Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH):** esta técnica utiliza uma sonda (sequência de DNA) complementar ao alvo que se pretende pesquisar. A vantagem desta técnica reside em três aspectos: rapidez, sensibilidade e especificidade. Ela é de grande utilidade no diagnóstico da LPA, pois em poucas horas tem-se a informação da presença ou não do rearranjo PML/RARA, direcionando o tratamento. Porém, como só será encontrado aquilo que for investigado, outros rearranjos podem não ser detectados, sendo, portanto, sempre recomendada a realização do cariótipo convencional por banda G, concomitantemente. A par dessas vantagens, a utilização de sondas de FISH tem sido bastante útil na detecção de clones menores eventualmente invisíveis pela citogenética convencional, quando a célula alterada não entra em divisão e, consequentemente, não se observa alteração no cariótipo (clones mascarados), na confirmação de alterações citogenéticas complexas ou na determinação de quimera pós-transplante.

Além disso, após o tratamento é possível avaliar a presença de doença residual por esse método, ainda que o nível de sensibilidade seja inferior a algumas técnicas moleculares (RT-PCR de alta resolução ou quantitativa).

**Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR):** esta

técnica tem sido bastante útil, particularmente na detecção de doença residual. Com efeito, uma vez determinada, ao diagnóstico, qual a alteração genética presente, deve-se conferir seu desaparecimento por métodos mais sensíveis. Assim, casos de LPA com t(15;17) ou rearranjo PML/RARA devem ser monitorados até o desaparecimento do rearranjo e a subsequente manutenção desta negatividade para assegurar a remissão completa contínua. A presença de positividade pode indicar recrudescimento da doença. No entanto, há situações que merecem atenção especial, como a t(8;21) ou AML1/ETO, na qual a positividade nem sempre indica possível recaída, uma vez que há casos descritos com PCR positiva em remissão completa há anos.

**Outras análises moleculares:** graças ao estudo molecular nos locais de quebras cromossômicas, foi possível descrever diversos proto-oncogenes ou oncogenes que são ativados, desligados ou desregulados pela alteração citogenética, desencadeando ou facilitando o processo neoplásico maligno. O entendimento, por meio de estudos moleculares, das alterações cromossômicas na LMA demonstrou que a grande maioria delas resulta em fusão de genes normalmente envolvidos na regulação do desenvolvimento das células sanguíneas. Os produtos proteicos anormais produzidos por esses genes quiméricos, que frequentemente são fatores de transcrição, são capazes de desregular a proliferação, a diferenciação e a apoptose dos precursores hematopoiéticos. Consequências semelhantes ocorrem pela perda de função ou mutação de gene supressor tumoral. Dentre as alterações que se destacam em termos prognósticos incluem-se mutação interna em tandem do FLT3, NPM1, c-KIT, WT1, CEBPA, RAS, etc.

**Figura 20.1**

Alterações cromossômicas na LMA.



Em resumo, genes que controlam as funções celulares básicas como sinalização intra e extracelular, balanço entre proliferação celular e morte, pontos de checagem, reparo e ciclagem estão direta ou indiretamente envolvidos nas vias leucêmicas. É provável, portanto, que muitos pacientes com cariótipo normal sejam, no futuro, reconhecidos como tendo anomalias cromossômicas recorrentes ou moleculares que permitirão que suas doenças sejam mais bem caracterizadas. Nesse novo cenário, pacientes com t(8;21) com mutação c-KIT deixam de ser considerados como de bom prognóstico e ficam alocados no risco in-

termediário. Pacientes com cariótipo normal que eram alocados no prognóstico intermediário, se apresentarem isoladamente mutação NPM1, passam a ser considerados de bom prognóstico. Por outro lado, aqueles com cariótipo normal e mutação FLT3/ITD passam para risco desfavorável.

Novos métodos de investigação tais como expressão diferencial de genes e hibridização genômica comparativa a arranjos (CGHa), dentre outros, despontam como alternativas promissoras para auxiliar no entendimento da complexidade de fenômenos envolvidos na leucemia.

## Referências

1. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2322-33.
2. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4075-83.

## Leituras recomendadas

Craig FE, Foon KA. Foon Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):3941-67.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2006 Feb;7(2):85-97.

Maciejewski JP, Mufti GJ. Whole genome as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):965-74.

Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:169-77.

Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):431-48.

Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2183-9.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.

Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2505-15.

Wouters BJ, Löwenberg B, Delwel R. A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):291-8.



Maria de Lourdes L. F. Chauffaille

## Diagnóstico citogenético da síndrome mielodisplásica

### Introdução

A síndrome mielodisplásica (SMD) constitui um conjunto de doenças com proliferação clonal das células da medula óssea, caracterizado, nas fases iniciais, por pancitopenia devido à alteração na apoptose e na maturação das células e, nas fases mais tardias, por evolução para leucemia aguda, graças a bloqueio de diferenciação. Assim, de início, há citopenia isolada ou combinada das três séries, que piora progressivamente, podendo levar parte dos indivíduos acometidos a óbito por falência medular, enquanto outros evoluem da fase pré-leucêmica para a franca leucemia.

A etiologia é desconhecida, mas a exposição a agentes físicos e químicos pode predispor à doença. Ela incide preferencialmente em idosos, porém jovens também podem padecer dessa enfermidade e, em especial, aqueles que se submeteram a tratamento químico ou radioterápico para alguma neoplasia prévia (SMD secundária).

Mutação somática em célula progenitora pluripotente com consequente vantagem proliferativa é o fenômeno desencadeador. Segue-se um processo múltiplo de apoptose, proliferação e maturação alteradas, bem como capacidade limitada de autorrenovação das células precursoras e resposta inadequada a estímulos de fatores de crescimento, apesar de o número de receptores ser normal.

Historicamente, as pancitopenias eram reconhecidas como entidades pré-leucêmicas. A primeira classificação citomorfológica foi lançada pelo grupo de hematopatologistas

franco-americano-britânicos, o que permitiu uma homogeneização de linguagem e padronização de aspectos para o reconhecimento desse conjunto de doenças.<sup>1</sup> Os cinco subtipos inicialmente descritos pela classificação FAB, a saber, anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), distinguem grupos com evolução, prognóstico e sobrevida diferentes.

Seguiu-se a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS),<sup>2</sup> recentemente revisada,<sup>3</sup> que leva em conta, além dos aspectos citomorfológicos, as características clínicas, genéticas e moleculares (**Tabela 21.1**).

Dada a heterogeneidade da doença, e na tentativa de prever qual a possível evolução de cada situação ao diagnóstico, Greenberg e colaboradores<sup>4</sup> formularam o índice internacional de escore prognóstico (IPSS, de *international scoring system for evaluating prognosis*), que considera a porcentagem de blastos, o cariótipo e o número de citopenias, tendo se tornado amplamente utilizado. Mais recentemente, Malcovati e colaboradores,<sup>5</sup> baseando-se no IPSS e na classificação da OMS, formularam a WPSS, que é mais dinâmica, pois leva em conta também a necessidade transfusional (subtipo da OMS, cariótipo e necessidade transfusional). Ambas as classificações consideram as alterações cromossômicas obtidas pela análise do cariótipo, como baixo risco – cariótipo normal, -Y, del(20q) e del(5q) isoladas; risco intermediário – anormalias não classificadas como de baixo ou alto



risco; e alto risco – alterações envolvendo o cromossomo 7 e cariótipos complexos.

O estudo citogenético em SMD auxilia no diagnóstico, no prognóstico, na previsão de progressão da doença e na escolha terapêutica. Além disso, a presença de anormalidade citogenética confirma a monoclonalidade da doença, identifica a biologia peculiar, as entidades clínicas e proporciona auxílio fundamental no diagnóstico diferencial. O estudo deve ser feito preferencialmente em amostra de medula óssea ao diagnóstico e subsequentemente com a progressão da doença.

Alterações cromossômicas são observadas entre 30 e 50% dos pacientes com SMD primária

ao diagnóstico, e entre 80 a 90% das SMDs secundárias ou relacionadas à terapia.<sup>6</sup> As alterações mais frequentes são 5q-, -7 e +8.

Mais de 50% dos casos apresentam deleções cromossômicas, sendo as intersticiais mais comuns que as terminais, frequentemente com as seguintes regiões envolvidas: 5q-, 7q-, 20q-, 11q-, 13q-, 12p-, 17p-. Nos casos de baixo risco, geralmente as deleções são isoladas, enquanto que nos de alto risco elas são associadas. A monossomia é a segunda alteração mais comum, sendo geralmente -7, -5 e nulissomia Y. Tanto a deleção quanto a monossomia atuam pelo mesmo mecanismo, isto é, perda de um alelo de gene supressor tumo-

**TABELA 21.1**  
Aspectos citomorfológicos e características clínicas, genéticas e moleculares da síndrome mielodisplásica

Doença	Achados do SP	Achados da medula óssea
Citopenia refratária com displasia unilinhagem: Anemia refratária Citopenia refratária Trombocitopenia refratária	Monocitopenia ou bicitopenia 0 < 1% de blastos	Displasia em > 10% das células de uma linhagem; < 5% de blastos; < 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel	Anemia Ausência de blastos	> 15% de sideroblastos em anel; apenas displasia eritroide; < 5% de blastos
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens	Citopenias; 0 < 1% de blastos; ausência de Auer; < 1.000 monócitos/ $\mu$ L	Displasia em >10% das células em duas ou mais linhagens (neutrófilos e/ou eritroblastos e/ou megacariócitos)
Anemia refratária com excesso de blastos 1 (AREB1)	Citopenias; < 5% de blastos; ausência de Auer; < 1.000 monócitos/ $\mu$ L	Displasia uni ou multilinhagem; 5 a 9% de blastos; ausência de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos 2 (AREB2)	Citopenias; 5 a 19% de blastos; Auer (mesmo se < 5% de blastos); < 1.000 monócitos/ $\mu$ L	Displasia uni ou multilinhagem; 10 a 19% de blastos Auer (mesmo se < 10% de blastos)
SMD inclassificável	Citopenias; < 1% de blastos	Displasia em < 10% das células, com anormalidade citogenética considerada como evidência de doença, < 5% de blastos
SMD associada a del(5q) isolada	Anemia; contagem plaquetária normal ou aumentada; < 1% de blastos	Megacariócitos em número normal ou aumentado; hipobulados; < 5% de blastos; 5q- isolada; ausência de bastão de Auer

ral (GST) seguida por deleção microscópica do outro alelo. Assim, em GST, que normalmente age como recessivo e requer função normal dos dois alelos, ambos ficam inativos e incapazes de controlar o ciclo celular, os mecanismos de reparo de DNA e a apoptose. Trissomia é a terceira alteração mais frequente, geralmente +8, +11 e +21. Os rearranjos equilibrados são raros em SMD, mas mais frequentes em leucemia mieloide aguda, enquanto os não equilibrados ocorrem em cerca de 15% dos casos, em geral envolvendo os cromossomos 5 e 7. A **Tabela 21.2** mostra as alterações não equilibradas mais comuns em SMD e a **Tabela 21.3** mostra as equilibradas.

Nenhuma alteração cromossômica é específica de SMD, pois qualquer uma delas pode ser observada em outras doenças onco-ematológicas. A única com um subtipo específico é a 5q- isolada, que será detalhada a seguir.

Deleção 5q- isolada (anteriormente denominada síndrome 5q-)

A deleção 5q- isolada foi descrita pela primeira vez por Van den Berghe e colaborado-

TABELA 21.2 Alterações não equilibradas mais comuns em síndrome mielodisplásica

Alteração	SMD	SMD-t
+8	10%	
-7/7q-	10%	50%
-5/5q-	10%	40%
del20q	5-8%	
-Y	5%	
i(17q)	5%	
-13/13q-	3%	
11q-	3%	
12p-/t12p	3%	
9p-	1-2%	
idic(X)(q13)	1-2%	

res<sup>7</sup> e se caracteriza por anemia refratária, acometendo, geralmente, mulheres idosas com idade mediana de 60 anos, anemia macrocítica, leve leucopenia e contagem plaquetária normal com numerosos megacariócitos hipo ou monolobulados. A maioria dos indivíduos afetados acaba evoluindo para a dependência de transfusão de hemácias e consequente necessidade de quelação de ferro, mas raramente sofre transformação para leucemia aguda.<sup>8</sup> A deleção incide em cerca de 10% dos casos, embora em nosso meio aparentemente sua incidência seja menor (< 5%) e tenha fenômenos autoimunes concomitantes.<sup>9</sup>

A região implicada na 5q- isolada e frequentemente deletada é a 5q31, ao passo que outras regiões deletadas são associadas a anormalias em outros cromossomos e à presença de > 5% de blastos. Mais de 41 genes já foram descritos na região comum de perda.<sup>10</sup> A inativação de GST é amplamente aceita como evento importante, e o gene RPS14 foi descrito recentemente. Em modelos animais, a haploinsuficiência deste gene leva a fenótipo típico de 5q- isolada, enquanto, por outro lado, em experimentos laboratoriais, o estímulo desse gene em culturas de medula de indivíduos com a deleção demonstrou reconstituição da hematopoiese.<sup>11</sup>

A importância da detecção desta anormalidade também se justifica pelo fato de haver tratamento dirigido para a 5q- isolada. A lenalidomida é a droga imunomoduladora que reduz a necessidade transfusional e reverte as anormalidades citogenéticas em dois terços dos casos (**Figura 21.1**).

TABELA 21.3 Alterações equilibradas mais comuns em síndrome mielodisplásica

Rearranjo	SMD	SMDt
t(11;16)(q23;p13.3)		3%
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2%
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%	
t(2;11)(p21;q26.2)	1%	
inv(3)(q21q26.2)	1%	
t(6;9)(p23;q34)	1%	

## Monossomia 7 e deleção do braço curto do 7 (-7/7q-)

A deleção completa ou parcial do braço longo do cromossomo ou a monossomia 7 são achados frequentes em 10% das SMDs. Também são comumente observados em associação a outras anomalias, como 5q-. Alterações do 7 são detectadas em adultos com AREB e frequentemente estão correlacionadas a curta sobrevida, com mediana de 14 meses<sup>12</sup> ou evolução para leucemia.

Ainda não se sabe quais genes situados no cromossomo 7 seriam os responsáveis pelo fenótipo da doença, porém a região frequentemente deletada é a 7q22.1.<sup>10</sup>

A monossomia 7 é observada em uma entidade com curso clínico agressivo, chamada de leucemia mielomonocítica juvenil, que apresenta esta anomalia em cerca de 40% dos casos.<sup>2</sup>

## Deleção 20q (20q-)

A deleção 20q está presente em aproximadamente 5% dos casos de SMD e confere prognóstico relativamente favorável. Os GSTs candidatos que se localizam dentro da região deletada são o *TPO1* e o *PLC1*, que têm função na transdução de sinal (**Figura 21.2**).

## Deleção 17p (17p-, i17q)

A síndrome de deleção do braço curto do cromossomo 17 (17p-) é habitualmente

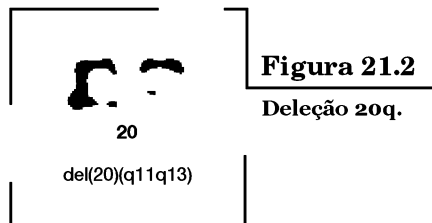
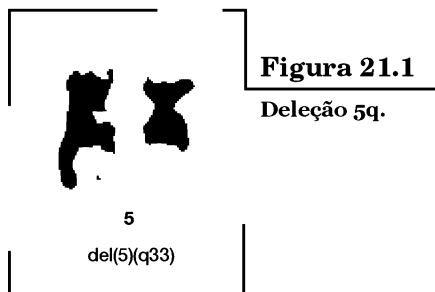
observada em SMD relacionada a terapia e raramente em SMD primária. Do ponto de vista hematológico, caracteriza-se por disgranulopoiese, anomalia de pseudo-Pelger-Huet e pequena vacuolização dos neutrófilos. A *P53* é uma fosfoproteína localizada no 17p13.1 e regula a replicação do DNA, a proliferação e a morte celular, o que a torna um GST.<sup>13</sup>

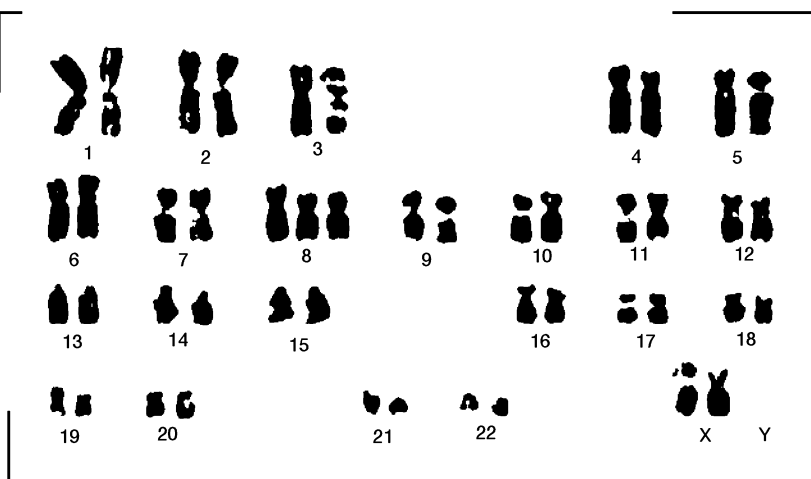
## Trissomia 8

A trissomia 8 é a alteração numérica mais comum e parece ser predominante no sexo masculino. Ela não se associa a nenhum subtipo específico, mas geralmente se apresenta com citopenia de uma ou três linhagens. Solé e colaboradores<sup>14</sup> demonstraram que pacientes com trissomia 8 como anomalia isolada têm risco significativamente maior de transformação leucêmica e pior comportamento do que o esperado para o grupo intermediário do IPSS, lançando dúvidas quanto à definição prognóstica (**Figura 21.3**).

## Nulissomia Y

A nulissomia Y tanto pode representar o clone maligno como pode ser um fenômeno senescente na medula de indivíduos idosos saudáveis, sendo observada em cerca de 10% dos idosos. A razão para essa perda com o avançar da idade seria explicada pelo efeito cumulativo de erros na divisão celular ou por vantagem proliferativa do clone -Y, que gradualmente substitui as células XY.<sup>8,15</sup>



**Figura 21.3****Trissomia do cromossomo 8.**

### Deleções do braço longo do cromossomo 11, do braço curto do 12 e do braço longo do 13 (del 11q, del 12p, del 13q)

Diversas outras anomalias são observadas em menor frequência em SMD, a exemplo de del 11q, del 12p, del 13q, além de translocações estruturais.<sup>16</sup>

### Diferenças entre síndrome mielodisplásica primária e secundária

As diferenças entre as SMDs primárias e secundárias, em termos citogenéticos, são principalmente quantitativas, embora raras qualitativas possam ser observadas. Geralmente, as SMDs secundárias têm maior porcentagem de

alterações cromossômicas clonais (80 a 95% versus cerca de 50% nas primárias), maior porcentagem de cariótipos complexos (5,3 aberrações por caso) e maior porcentagem de clones citogenéticos não relacionados (5,7% versus 4,3% nas primárias).

### Uso de hibridização *in situ* por fluorescência em síndrome mielodisplásica

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido de grande valia em SMD, em particular para os casos em que não se obtiveram metáfases ou que o cariótipo não foi informativo. O uso de um painel de sondas almejando as principais regiões acometidas na doença, tais como centrômeros de 5, 7, 8 e XY, e regiões 5q31, 7q, 20q11-3 e 17p11, é importante para ampliar a taxa de detecção de anormalidades.<sup>17</sup>

### Referências

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1982 Jun; 51(2):189-99,
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. WHO classification of tumors: pathology

and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.

3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, et al. International scoring system for

- evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079-88.
5. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3503-10.
6. Olney HJ, Le Beau MM. Best Pract Res Clin Haematol. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):479-95.
7. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of the long arm of no 5 chromosome. *Nature*. 1974 Oct 4;251(5474):437-8.
8. Mhawech P, Saleem A. Myelodysplastic syndrome : review of the cytogenetic and molecular data. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001 Dec;40(3):229-38.
9. Pinheiro RF, Silva MR, Chauffaille Mde L. The 5q- syndrome and autoimmune phenomena: report of three cases. *Leuk Res*. 2006 Apr;30(4):507-10
10. Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol*. 2008 Oct;87(10):777-95.
11. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17;451(7176):335-9.
12. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4385-95.
13. Pinheiro RF, Chauffaille Mde L, Silva MR. Cancer Genet Cytogenet. Isochromosome 17q in MDS: a marker of a distinct entity. 2006 Apr 15;166(2):189-90.
14. Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, et al Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. *Br J Haematol*. 2000 Feb;108(2):346-56.
15. Elias R, Chauffaille ML. Nulissomia Y: senilidade ou clone maligno? In: 26º Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2003 ago 6-9; São Paulo, SP.
16. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1995.
17. Romeo M, Chauffaille Mde L, Silva MR, Bahia DM, Kerbauy J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*. 2002 Nov;26(11):993-6.

Maria de Lourdes L. F. Chauffaille

# Diagnóstico citogenético das síndromes mieloproliferativas crônicas

## Introdução

As síndromes mieloproliferativas crônicas são doenças clonais de célula-tronco hematopoiética nas quais há proliferação aumentada das séries mieloides com maturação eficaz, o que leva a leucocitose no sangue periférico, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose. Várias destas síndromes progridem para fibrose medular ou transformação leucêmica.<sup>1</sup> De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), as neoplasias mieloproliferativas englobam várias doenças, tais como leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera, mielofibrose primária, trombocitemia essencial, leucemia eosinofílica crônica, mastocitose e neoplasia mieloproliferativa inclassificável. A seguir, são descritas a policitemia vera, a mielofibrose, a trombocitemia essencial e a leucemia eosinofílica crônica.

## Policitemia vera

A policitemia vera (PV) é um pouco mais frequente em homens que em mulheres. Os sintomas mais comuns são cefaleia, pletora, fenômenos tromboembólicos, sangramento gastrointestinal, cansaço, tontura e sudorese. Trombose costuma ser a causa mais comum de morte e, na fase tardia da doença, há risco de fibrose medular ou transformação em leucemia aguda.<sup>1,2</sup>

A doença cursa com três fases: a fase prodrômica ou pré-policitemica, inicial, na qual há apenas eritrocitose discreta ou limitrofe; a fase pletórica, com a sintomatologia descrita anteriormente; e a fase tardia, de esgotamento ou consumo, na qual há fibrose medular e as queixas são de fraqueza pela anemia e desconforto abdominal pela esplenomegalia evidente.<sup>1,2</sup>

A descoberta da mutação adquirida JAK2V617F, que é a troca de guanina por timidina e que resulta na substituição de valina por fenilalanina no códon 617 do gene JAK2, permitiu a compreensão da patogênese desse grupo de doenças. Essa mutação leva à ativação constitutiva de tirosina-quinase e, ainda que tal mecanismo não esteja completamente compreendido, resulta em proliferação e diferenciação celular mieloide. Outras mutações ativadoras de JAK2 (p. ex., éxon 12) também foram descritas, porém são mais raras.<sup>1,3</sup>

A mutação JAK2V617F é observada em cerca de 90% dos casos de PV, mas também em cerca de 50% dos casos de mielofibrose primária e trombocitemia essencial.

**Cariótipo:** alterações cromossômicas são observadas em cerca de 10 a 30% dos casos ao diagnóstico, sendo as mais comuns +8, +9, del(20q), ganho de material no 1q, del(1q) e del(13q). Com o progredir da doença, a taxa de anormalidade citogenética atinge algo em torno de 80%, particularmente nos casos em fase fibrótica pós-policitemica, chegando a quase 100% nos casos transformados em leucemia aguda (**Figura 22.1**).

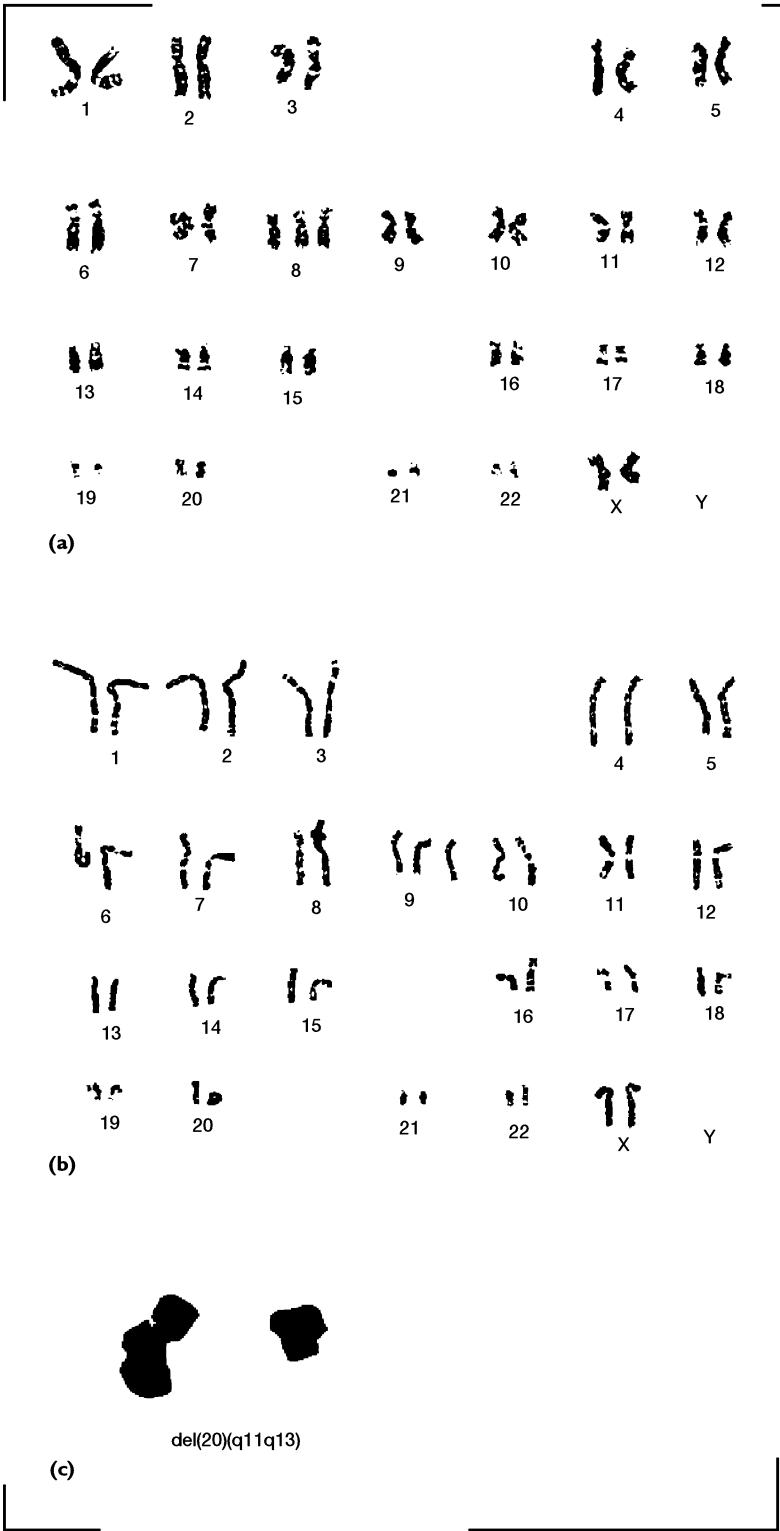


Figura 22.1

Alterações citogenéticas encontradas no cariótipo de medula óssea de pacientes com policitemia vera (PV): (a) trissomia do cromossomo 8; (b) trissomia do cromossomo 9; (c) deleção do braço longo do cromossomo 20.

## Mielofibrose primária

A mielofibrose primária (MF) é uma doença clonal originada da transformação neoplásica de célula hematopoiética pluripotente (célula-tronco) acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular com fibrose colagênica, osteosclerose e angiogênese. Ela caracteriza-se por esplenomegalia, reação leucoeritroblástica e citopenias com dacríocitos.<sup>4</sup>

A doença tem duas fases bem caracterizadas: fase pré-fibrótica, inicial, com medula óssea hiper celular que evolui até a quase substituição do tecido hematopoiético por fibras reticulínicas (fase fibrótica). A sobrevida varia de 3 a 10 anos. As causas de óbito são transformação leucêmica (em 5 a 10% dos casos), infecção, sangramento, trombose, falência cardíaca, falência hepática, aparecimento de outra neoplasia, falência respiratória e hipertensão portal.<sup>5,6</sup>

Na MF, a fibrose é devida à proliferação clonal de célula hematopoiética que leva à hiperplasia de megacariócitos morfologicamente normais e à população de monócitos que liberam fator de crescimento fibrogênico.<sup>6</sup> A mutação que resulta em perda de função do domínio autoinibidor da família Janus-quinase (JAK) de proteínas tirosina-quinase que envolve a sinalização de receptor de citocina, JAK2V617F, resulta em fosforilação ativa da JAK2. Essa mutação tem sido detectada em cerca de 50% dos pacientes com MF, os quais apresentam leucometria elevada e neutrofilia em relação àqueles JAK2V617F negativos, menor necessidade transfusional (provavelmente a mutação protege de anemia severa), mas doença clinicamente mais agressiva representada por pior sobrevida. A JAK2V617F está presente de forma homozigota em 13% dos casos de MF, situação em que se associa a anomalias cromossômicas desfavoráveis.<sup>6</sup> Mutações somáticas adicionais foram observadas em pacientes com MF e podem ter função na biogênese da doença. Mutação no domínio transmembrana do receptor de trombopoietina (cMPL) foi observada em 9% dos pacientes JAK2V617F negativos (MPLW515L ou MPLW515K), mas também em positivos.

Assim, a ideia corrente é de que mutações MPL favorecem o desenvolvimento de trombocitose, enquanto a mutação JAK2V617F predispõe à eritrocitose. No entanto, é difícil considerar cada uma das mutações como a única causa da MF, mas talvez a doença seja o acúmulo de múltiplas lesões genéticas e de eventos epigenéticos.<sup>2,4,6</sup>

**Cariótipo:** Pode haver dificuldade para a obtenção de amostra para análise devido à fibrose da medula. Apresenta-se alterado em 60% dos casos, com del(13q), del(20q), trissomia parcial 1q, além de +8 e +9. Trata-se de um exame importante para diferenciar da LMC, que apresenta o cromossomo *Philadelphia*, e de síndrome mielodisplásica, com alterações envolvendo 3q21q26 ou del(5q). Casos que apresentam alterações envolvendo os cromossomos 5 ou 7 são relacionados ao uso prévio de agentes quimioterápicos para tratamento de doença mieloproliferativa.

## Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial (TE) caracteriza-se pelo elevado número de plaquetas com hiperplasia megacariocítica, embora outros setores medulares também estejam afetados qualitativa ou quantitativamente.<sup>1</sup>

A mutação de ponto somática, adquirida, resultando na substituição de valina por fenilalanina na posição 617 do gene JAK2 (JAK2V617F) está presente em casos de TE primária, mas jamais é observada em casos de doença secundária.

**Cariótipo:** Deve sempre ser feito para investigar a presença do cromossomo *Philadelphia*, que identifica a doença como LMC, sendo, portanto, em primeiro lugar útil no diagnóstico diferencial. Não há alteração citogenética típica na TE, e o índice de alterações é de cerca de 5%. As mais frequentemente encontradas são trissomia 8 e 9, além de deleção 13q e 20q. Anormalidades tais como del(5q), t(3;3)(q21;q26,2) e inv(3)(q21q26,2), que são associadas à trombocitose, são características de síndrome mielodisplásica e de leucemia mieloide aguda.



## Leucemia eosinofílica crônica

A leucemia eosinofílica crônica (LEC) trata-se de proliferação autônoma e clonal de precursores eosinofílicos, resultando em mieloproliferação persistente na medula óssea, no sangue periférico e nos tecidos. A lesão orgânica ocorre como resultado da infiltração leucêmica ou da liberação de citocinas, enzimas ou outras proteínas pelos eosinófilos, sendo a mais importante a lesão cardíaca, na forma de endomiocardiofibrose.<sup>1</sup>

Para o diagnóstico de LEC, é necessário excluir os pacientes com LMC BCR/ABL1+ e os portadores dos rearranjos PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  ou FGFR1. A LEC é mais comum em homens, com relação de nove homens para cada mulher acometida, e o pico de incidência é entre 20 e 50 anos. Raros casos foram observados em lactentes e crianças.<sup>1</sup>

Os critérios diagnósticos para a LEC são:<sup>1</sup>

- eosinófilos  $\geq 1.500/\mu\text{L}$  no sangue periférico;
- ausência do cromossomo *Philadelphia*, BCR/ABL1+ ou outras neoplasias mieloproliferativas (PV, MF e TE) e síndrome mielodisplásica/mieloproliferativa;
- ausência de t(5;12)(q31-35;p13) ou outro rearranjo PDGFR $\beta$ ;
- ausência de rearranjo FIP1L1/PDGFR $\alpha$  ou outros PDGFR $\alpha$ ;
- ausência de rearranjo FGFR1;
- contagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea  $< 20\%$  e ausência de inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22) ou outra característica diagnóstica de leucemia mieloide aguda;
- anormalidade clonal citogenética ou molecular ou blastos  $> 2\%$  no sangue periférico ou  $> 5\%$  na medula óssea.

## Referências

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. Blood. 2008 Jul 15;112(2):231-9.
3. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. Blood. 2008 Apr 1;111(7):3863-6.
4. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. Blood. 2008 Sep 15;112(6):2190-8.
5. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. Blood. 2005 Feb 1;105(3):973-7.
6. Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007:1-10.

Paulo Ricardo Gazzola Zen  
Giorgio Adriano Paskulin  
Rafael Fabiano Machado Rosa

# Diagnóstico citogenético da leucemia linfocítica aguda

## Definição, epidemiologia e características clínicas

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é uma doença biológica e clinicamente heterogênea, caracterizada pela proliferação clonal com acúmulo de células linfoblásticas malignas na medula óssea e no sangue periférico. Ela é considerada uma doença da infância com um pico entre 2 e 5 anos de idade (cerca de 75% de todos os casos de LLA ocorrem em crianças com idade inferior a seis anos) e com uma incidência um pouco maior em indivíduos do sexo masculino.<sup>1-3</sup> A LLA é incomum em lactentes (2 a 4% dos casos),<sup>4</sup> sendo que sua frequência em adultos compreende cerca de um terço daquela que ocorre em crianças.<sup>5</sup>

Os sintomas apresentados pelos pacientes com LLA são secundários ao acúmulo de células e geralmente refletem o grau de falha da medula óssea e a extensão da disseminação extramedular. Entre os sintomas mais frequentemente encontrados estão fadiga, letargia, febre, linfadenopatia, sangramento e dores ósseas.<sup>3</sup>

A LLA pode ser classificada de acordo com o seu imunofenótipo, dependendo do tipo de diferenciação celular, sendo que 80 a 85% dos seus casos são do tipo de célula B precursora (LLA pré-B), ocorrendo predominantemente em crianças. A LLA de célula T precursora (LLA pré-T) é encontrada tanto em crianças

como em adultos.<sup>2</sup> Um subtipo distinto de LLA ocorre, ainda, em crianças menores de 12 meses de idade com um fenótipo do tipo pró-B ou monocítico-pró-B.<sup>6</sup>

## Etiologia

Muitos tipos de LLA são de causa ainda indefinida, mas é provável que estejam envolvidos em uma interação entre suscetibilidade herdada, ambiente, desenvolvimento hematopoietico e acaso.<sup>7</sup> Somente poucos casos (< 5%) estão associados a síndromes de predisposição genética como as síndromes de Down, Bloom, ataxia-telangiectasia e Nijmegen.<sup>3</sup> Esta diversidade tem sua origem nos diferentes tipos celulares que estão envolvidos e nas alterações moleculares específicas que representam as causas da expansão clonal. Estes aspectos básicos variam substancialmente em relação à idade do paciente, podendo ser de valor prognóstico independente, no contexto de um protocolo terapêutico em particular. Deste modo, eles são de valor diagnóstico e auxiliam no manejo do paciente, ajudando a explicar os diferentes prognósticos clínicos em LLA.<sup>8-11</sup> Numerosos fatores de risco dependentes de exposição têm sido propostos para as LLAs da infância.<sup>5,12</sup> Eles podem ser classificados com base em sua ligação com janelas de exposição potencialmente críticas, que são associadas com o modelo de múltiplos estágios de Greaves. Este modelo envolve um possí-

vel evento iniciador pré-natal e um segundo evento pós-natal.<sup>5</sup>

Apesar de existir somente uma modesta variabilidade na aparência das células leucêmicas entre um e outro paciente com LLA, há uma significativa diferença na patologia citogenética e molecular subjacente, com numerosos subtipos genéticos distintos já identificados.<sup>13</sup> Os mecanismos que levam à indução das LLAs incluem a expressão aberrante de proto-oncogenes, as translocações cromossômicas e a hiperdiploidia (excesso de cromossomos). Essas alterações genéticas contribuem para a transformação leucêmica das células-tronco hematopoieticas ou de suas progenitoras comprometidas por funções celulares modificadas. Elas alteram processos reguladores essenciais para a manutenção ou o aumento da capacidade ilimitada para autorrenovação, subvertendo os controles da proliferação normal, de bloqueio da diferenciação, e promovendo resistência à apoptose.<sup>14</sup>

Nos últimos 20 anos, as análises das linhagens celulares envolvidas na gênese das leucemias usando marcadores cromossômicos, genes marcadores mutantes ou rearranjados, rearranjos dos genes de receptores de células T e de cadeia pesada de imunoglobulinas, e de polimorfismos ligados ao cromossomo X (como marcadores clonais em mulheres) têm fornecido testes mais específicos para determinar a etiologia celular destas neoplasias. Com base nestas análises, demonstrou-se a origem monoclonal de todas as leucemias, e foram obtidos novos conhecimentos sobre a célula-alvo e o seu estágio de desenvolvimento, que foram correlacionados com a mutação inicial e com a seleção clonal.<sup>15</sup> Embora a frequência de subtipos genéticos particulares das LLAs seja diferente em adultos e crianças, os seus mecanismos patogénéticos gerais subjacentes são similares.<sup>14</sup>

## Anormalidades citogenéticas em leucemia linfocítica aguda

Durante as décadas de 1960 e 1970, anormalidades cromossômicas específicas foram identificadas dentro de diferentes subtipos de leu-

cemias, sendo que de grande significância foi a descoberta da associação destas alterações com a forma de evolução clínica apresentada pelos pacientes.<sup>16</sup> Atualmente, a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza a caracterização biológica das leucemias, incluindo a utilização de marcadores citogenéticos.<sup>17,18</sup> Para o seguimento destas diretrizes, a abordagem a esta complexidade genética na LLA somente é obtida pela combinação de diversos métodos que são complementares: a citomorfologia, a citoquímica e a imunofenotipagem permitem a categorização em diferentes linhagens. A citogenética convencional, pelo exame de cariótipo, provê informações sobre as anomalias microscopicamente visíveis, enquanto a citogenética molecular, com técnicas como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e a hibridização genômica comparativa (CGH), é capaz de esclarecer rearranjos complexos e detectar alterações submicroscópicas, que escapam da identificação pela cariotipagem de rotina. Por sua vez, as técnicas moleculares identificam alterações gênicas, definem algumas mutações não detectáveis por outras técnicas e são mais sensíveis que a FISH na detecção da doença residual mínima (DRM). A utilização combinada destes métodos leva a uma classificação correta no momento do diagnóstico inicial, define parâmetros para a detecção de DRM durante a remissão completa morfológica e hematológica e, por consequência, reduz o trabalho, os custos e o tempo de tratamento ao mínimo necessário.<sup>18</sup> Entretanto, é importante estar ciente de que a citogenética convencional continua sendo o principal método laboratorial de rotina para a detecção de anormalidades genéticas dentro do meio clínico.<sup>16</sup>

Do ponto de vista citogenético, as anormalidades cromossômicas em LLA já são bem conhecidas e classificadas. Anormalidades clonais são detectadas em 50 a 70% das medulas ósseas dos pacientes com LLA e representam o mais importante parâmetro laboratorial de prognóstico,<sup>2,18,19</sup> sendo a resposta ao tratamento o parâmetro clínico mais importante. Embora os tipos de anomalias cromossômicas sejam semelhantes em crianças e adultos, a sua distribuição e possivelmente o seu significado biológico são diferentes. Assim, uma interpretação acurada do cariótipo é essencial para avaliar a importância destas distinções.

Estas anormalidades cromossômicas podem ser tanto estruturais como numéricas, sendo que em muitos cariótipos ambas as alterações podem estar presentes. Fazem parte das anomalias estruturais as translocações, as deleções, as inversões e outros rearranjos envolvendo genes com potencial oncogênico. Algumas alterações estruturais estão associadas com LLA-B, enquanto que outras são especificamente encontradas em LLA-T. Elas em geral envolvem genes implicados nos processos normais de diferenciação celular,<sup>20</sup> levando à justaposição de genes inteiros ou de segmentos gênicos. Isto leva à formação de genes híbridos que, ao apresentarem uma modificação na sua função original, podem ter potencial leucemogênico. De modo geral, estas anomalias cromossômicas podem gerar alterações em:

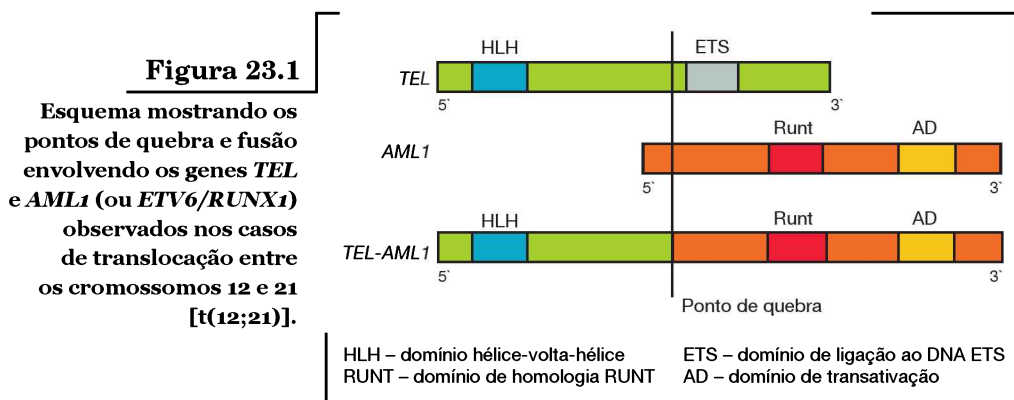
- proto-oncogenes (envolvidos no controle do crescimento celular), nos quais a mutação leva a um ganho de função;
- genes supressores tumorais (que exercem sua função no controle da proliferação celular), em que a mutação leva à perda de função; e
- v genes de reparo de danos no DNA (que, quando alterados, “permitem” o acúmulo de mutações) (ver **Figura 23.1**).<sup>3,21</sup>

Nas LLAs da infância, muitas dessas anomalias são translocações cromossômicas balanceadas que estão correlacionadas com subgrupos imunológicos específicos.<sup>22</sup> A anormalidade estrutural mais frequente é a  $t(12;21)$  (*TEL/AML1* ou *ETV6/RUNX1*), ocorrendo em

20 a 25% dos casos. A  $t(11;v)(q23;v)$  envolvendo o gene *MLL* e a  $t(v;14)$  e  $t(7;v)$  envolvendo o gene *TCR* ocorrem em 10% dos casos (onde v significa cromossomo envolvido variável). A  $t(1;19)$  (*E2A/PBX1*) e a  $t(9;22)$  (*BCR/ABL*), com formação do cromossomo *Philadelphia*, ocorrem em 5 e 4% dos casos, respectivamente. Outras translocações menos comuns são observadas em 20% dos pacientes, sendo que nenhum destes rearranjos cromossômicos é identificado em 30% dos casos.<sup>23-25</sup> No caso da LLA em adultos, a  $t(9;22)$  é a alteração citogenética mais frequente, sendo observada em cerca de um terço dos casos.<sup>3</sup> Em lactentes, 70% possuem translocações envolvendo a região 11q23 (com envolvimento do gene *MLL*), provavelmente ocorridas ainda intraútero (ver **Figuras 23.2 e 23.3**).<sup>2</sup>

Quanto aos subtipos de LLA, os casos com fenótipo do tipo de células T apresentam uma menor percentagem de anormalidades citogenéticas (60 a 70%) do que os de células B (cerca de 80%). Por outro lado, muitas alterações observadas em LLA-T são crípticas, isto é, são anormalidades não detectadas pela cariotipagem convencional.<sup>26</sup> As análises das sequências genômicas dos genes fusionados indicam que o mecanismo predominante que leva a estas translocações cromossômicas é uma ruptura na fita dupla de DNA, seguida de reparo normal, mas levando a um erro pela recombinação das junções finais não homólogas. Estas observações nos levam à questão sobre o que causa o dano inicial ao DNA.<sup>4</sup>

Mais recentemente, com o advento das técnicas de FISH e CGH, novos rearranjos submicroscópicos envolvendo genes relacionados



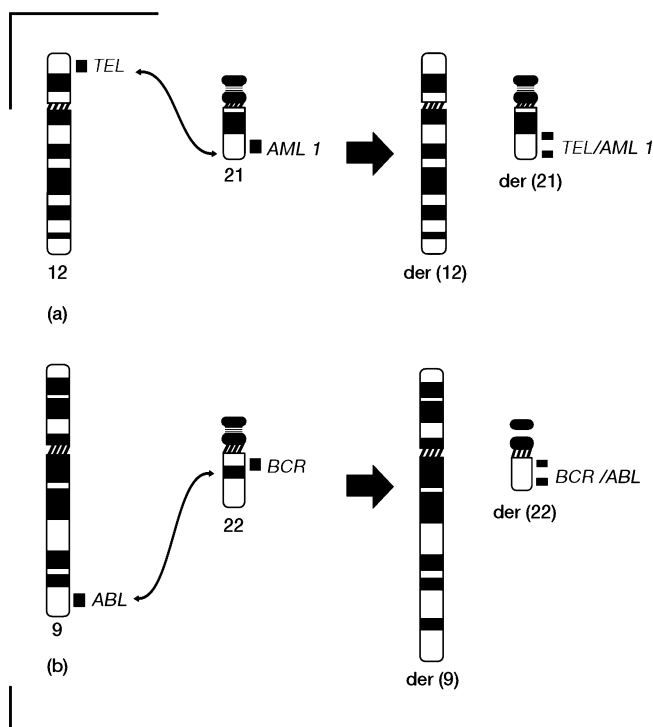
à leucemogênese têm sido identificados em pacientes com LLA. Por exemplo, a amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21), previamente conhecida como amplificação do gene *RUNX1*, tem sido reconhecida como uma anormalidade recorrente na LLA da infância.<sup>27</sup>

Por sua vez, mudanças cromossômicas numéricas levam a clones com mais ou menos cópias de um ou mais cromossomos. Estas mudanças são classificadas de acordo com o número de cromossomos alterados.<sup>10,28</sup> Nas LLAs, as células leucêmicas hiperdiploides com mais de 50 cromossomos apresentam um complemento cromossômico específico que depende do seu número modal. A aquisição de cópias extras de cada cromossomo ocorre em um padrão previsível, sendo que o indício de que um cromossomo está presente em uma ou mais cópias extras depende do número de cromossomos ganhos. O padrão de ganhos de cromossomos extras sugere que os mecanismos que resultam em cariótipo hiperdiploide com 51 a 67 cromossomos são diferentes daqueles que resultam em cariótipo quase triploide (68 a 79 cromossomos) e quase tetraploide ( $\geq 80$  cromossomos) (ver **Figura 23.4**).

O mecanismo subjacente deste fenômeno ainda é desconhecido. As mitoses que resultam em hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos podem afetar cada cromossomo diferentemente, tanto que cromossomos adicionais específicos são mais provavelmente distribuídos de forma não aleatória.<sup>2,29</sup>

A frequência e o tipo de alterações numéricas e estruturais dos cromossomos variam também de acordo com os subtipos biológicos de LLA e a faixa etária dos pacientes. No caso de LLA pré-B, a hiperdiploidia, com mais de 50 cromossomos por célula leucêmica, e a fusão *TEL/AML1* são responsáveis por aproximadamente 50% dos casos da infância, mas somente por 10% dos casos do adulto.<sup>23,28,30</sup> Com relação à LLA de célula T, as translocações frequentemente envolvem um *locus* de um gene de receptor de célula T localizado nas regiões 14q11, 7q34 e 7p14.<sup>25</sup>

A hipodiploidia ( $< 45$  cromossomos por célula leucêmica) é encontrada em menos de 2% dos casos pediátricos e adultos de LLA.<sup>28</sup> A *t*(4;11) (*MLL/AF4*) ocorre em 50% dos casos em lactentes, 2% dos casos em crianças e 5 a 6% dos casos em LLA de adultos, enquan-

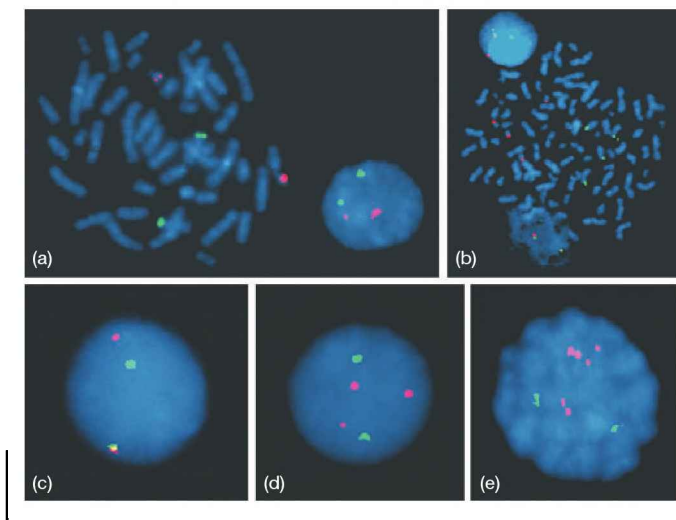


**Figura 23.2**

Ideograma mostrando os produtos resultantes da translocação *t*(12;21), a fusão *TEL/AML1* (ou *ETV6/RUNX1*) (a), e da translocação *t*(9;22), a fusão *BCR/ABL* (b). Estes padrões de sinais (vermelhos e verdes, além dos amarelos devido à junção dos sinais anteriores) são visualizados na análise pela técnica de FISH. Note que, no caso da *t*(12;21), a troca entre os segmentos cromossômicos envolve uma banda clara do cromossomo 12 e do 21, o que acaba dificultando sua identificação pela citogenética convencional.

**Figura 23.3**

Imagens da técnica de FISH utilizando-se da sonda TEL (verde) e AML1 (vermelho), mostrando uma metáfase com 46 cromossomos e um núcleo interfásico com um padrão normal de sinais (a); uma metáfase tetraploide (b); um núcleo interfásico com o sinal de fusão TEL/AML1 (sinal amarelo) (c), e um núcleo interfásico e uma metáfase apresentando três cópias de AML1 (d e e, respectivamente).



to que a  $t(9;22)$  (*BCR/ABL*) ocorre em 3% dos casos em crianças, em 20% dos casos em adultos e em mais de 50% dos casos em pacientes maiores de 50 anos de idade.<sup>2,14,30</sup> De modo interessante, a  $t(1;19)$  é o único rearranjo que ocorre na maioria dos grupos etários com aproximadamente a mesma frequência. Crianças mais velhas e adolescentes constituem os maiores grupos com anormalidades cromossômicas não especificadas, indicando seu potencial para a descoberta de novas alterações citogenéticas (Figura 23.5).<sup>25</sup>

Hoje também já está bem estabelecida a possível origem pré-natal de algumas LLAs, principalmente aquelas envolvendo a região 11q23, como a  $t(4;11)$ , as leucemias congênicas

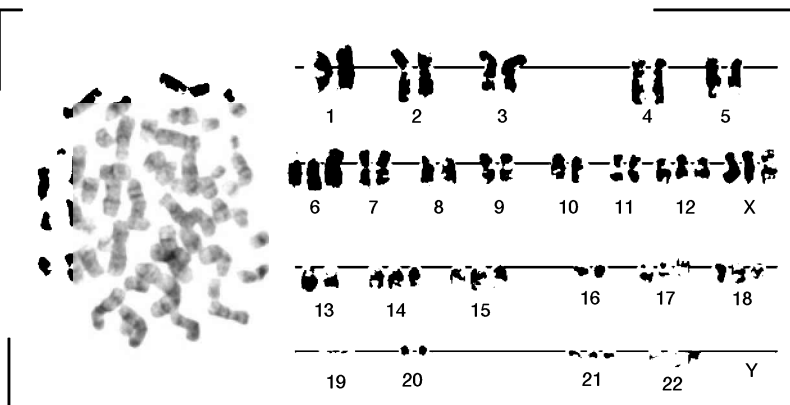
e aquelas envolvendo a  $t(12;21)$ . Entretanto, devemos ter em mente que a maioria dos casos de leucemia envolve um evento indutor que costuma ocorrer no período pós-natal (ver Tabela 23.1).<sup>31-34</sup>

### Significado clínico e prognóstico das anormalidades citogenéticas em leucemia linfocítica aguda

As alterações cromossômicas são tradicionalmente utilizadas como marcadores diag-

**Figura 23.4**

Cariótipo por bandas GTG mostrando uma metáfase hiperdiploide.



nósticos e prognósticos no manejo de pacientes com LLA. Seu significado é semelhante ou até mesmo maior que o de outros fatores como a idade ao diagnóstico e a contagem de leucócitos.<sup>3</sup> O uso da citogenética molecular tem também mostrado que anormalidades genéticas levando à leucemogênese frequentemente ocorrem em nível submicroscópico.<sup>16</sup>

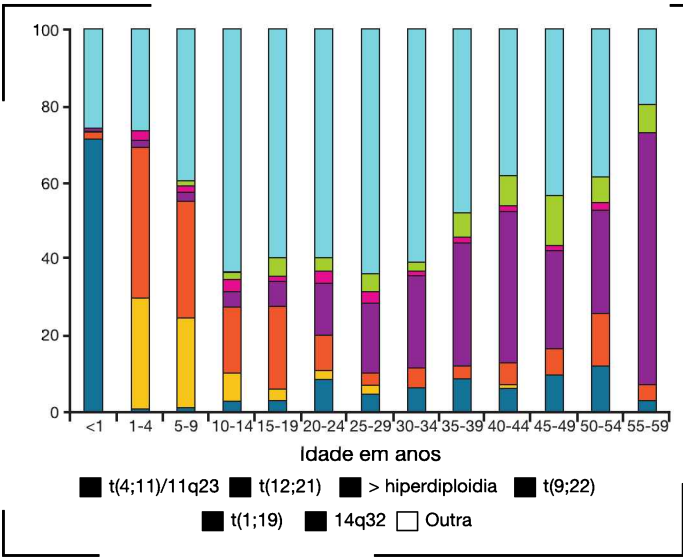
Secker-walker e colaboradores<sup>35</sup> foram os primeiros a descrever a associação prognóstica dos achados cromossômicos em LLA. Assim, no período de 1980 a 1990, o significado prognóstico de uma série de anomalias cromossômicas começou a ser reconhecido, progressivamente passando a ser incorporado aos protocolos terapêuticos das LLAs.<sup>36,37</sup> Atualmente, sabe-se que diversas alterações cromossômicas, numéricas ou estruturais, observadas citogeneticamente, estão associadas à ocorrência de quadro clínico de leucemia que apresenta uma evolução com melhor ou pior prognóstico. Deste modo, quanto aos grupos de risco citogenético em LLA-B, diferentes grupos prognósticos foram caracterizados: o cariótipo hiperdiploide com mais de 50 cromossomos e os casos de t(8;14) (*MYC/TCR*) são indicadores de bom prognóstico; a t(1;19) (*E2A/PBX1*) apresenta um prognóstico de intermediário a bom; o cariótipo hiperdiploide com 47 a 50 cromossomos indica um prognóstico intermediário; enquanto o cariótipo quase-haploide, as t(9;22) (*BCR/ABL*) e

t(4;11) (*MLL/AF4*) e as anomalias envolvendo a região 11q23 (*MLL*) indicam um prognóstico pobre (ver **Tabela 23.2**).<sup>2,3,10,22,38-41</sup>

É interessante salientar que o prognóstico favorável dos grupos hiperdiploides ocorre quando estão desacompanhados de alterações estruturais. Caso contrário, o prognóstico assumido é o da anomalia estrutural. A hiperdiploidia de 52 a 58 cromossomos, um bom marcador prognóstico, foi previamente descrita como não sendo associada com a t(12;21).<sup>42</sup>

A idade dos pacientes também possui influência sobre o prognóstico relacionado às anormalidades citogenéticas. Contudo, até hoje se desconhece o motivo para isto. Por exemplo, crianças com idade entre 1 e 9 anos apresentando a t(9;22) possuem um prognóstico melhor do que adolescentes com a mesma anormalidade. Estes, por sua vez, possuem um prognóstico mais favorável que o de adultos. Em pacientes com a fusão *MLL/AF4*, bebês e adultos têm um pior prognóstico do que crianças. A t(1;19) com a fusão *E2A/PBX1* não possui implicações prognósticas na LLA da infância, mas é associada com um prognóstico pobre em casos adultos.<sup>3,43</sup>

Todas estas informações têm permitido classificar a doença leucêmica em distintos grupos de risco, com diferentes alternativas terapêuticas. Por outro lado, a identificação



**Figura 23.5**  
Distribuição das principais anormalidades citogenéticas em LLA (em %), de acordo com a faixa etária dos pacientes. Fonte: Adaptada de Harrison.<sup>16</sup>



de subgrupos de mau prognóstico levou à pesquisa de novos protocolos de tratamento e/ou à introdução de terapias alternativas mais agressivas. Como consequência, houve uma modificação nas taxas de remissão e sobrevida.<sup>22</sup> Nas LLAs da infância, a situação em relação ao tratamento realmente começou a melhorar a partir dos resultados dos estudos sistemáticos que foram conduzidos por Don Pinkel e seus associados no St. Jude Children's Research Hospital. A observação dos resultados das crianças tratadas nos períodos de 1962 a 1966, de 1967 a 1979 e de 1984 a 1988, em uma sequência de protocolos que foram sendo refinados, mostrou que a modificação metódica dos programas de quimioterapia produziu uma gratificante e surpreendente melhora no resultado do tratamento desta doença que era quase sempre fatal.<sup>44</sup>

Atualmente, a sobrevida livre de eventos em cinco anos é estimada em 91% para indivíduos com LLA e hiperdiploidia, 89% para aqueles com fusão *TEL/AML1*, 86% para fusão *E2A-PBX1*, 82% para outras alterações de

linhagem B, 73% para a LLA de células T, 37% para a fusão *BCR/ABL*, e 32% para a fusão *MLL/AF4* (ver **Tabela 23.3**).<sup>3</sup>

Os conceitos modernos de terapia têm como base a estratificação de risco individual ao diagnóstico e durante o seguimento. As melhoras atuais obtidas em relação à cura e ao tratamento estão tendo como base o conhecimento biológico. Este conhecimento deve incluir uma abordagem diagnóstica completa, combinando dados clínicos e laboratoriais como a citogenética convencional e a FISH. Deste modo, pode-se chegar a uma classificação e a um prognóstico exatos no momento do diagnóstico e à identificação de marcadores sensíveis para estudos de DRM.<sup>18,46</sup>

Hoje, já existe uma série de informações sobre a caracterização biológica das LLAs que nos auxiliam no delineamento de seu manuseio terapêutico. Tecnologias emergentes surgidas através da farmacogenética têm criado a perspectiva futura de desenvolvimento de drogas capazes de agir especificamente sobre os defeitos genéticos das cé-

**TABELA 23.1**  
Principais subtipos biológicos e alterações cromossômicas nas leucemias linfocíticas agudas da infância

Tipo celular envolvido	Anomalia cromossômica	Alteração molecular	Frequência (%)	Produto funcional
Progenitor-monocítico de célula B <sup>a</sup> (lactentes)	Translocações em 11q23	MLL/AF4, MLL/ENL e outras fusões	~85 LLA de lactente ~5 do total de LLA	Fator de transcrição modificado (FTM) <sup>b</sup>
Precursor de célula B (pré-B)	Hiperdiploidia	Aumento da dose de genes	~35 LLA pré-B	Desconhecido
	t(12;21)(p13;q22)	Fusão TEL/AML1	~20 LLA pré-B	Fator de transcrição quimérico (FTQ) <sup>c</sup>
	t(1;19)(q23;p13)	Fusão E2A/PBX1	~5 LLA pré-B	FTQ
	t(9;22)(q34;q11)	Fusão BCR/ABL	~5 LLA pré-B	Quinase ativada
	Amplificação iAMP21	Amplificação do RUNX1	~2 LLA pré-B	Desconhecido
Precursor de célula T	Deleção 1q, t(1;14)(p32;q11)	Fusão SIL/SCL	~25 LLA de célula T precursora	Fator de transcrição desregulado (SCL/TAL1)

<sup>a</sup> Este subtipo de leucemia apresenta aspectos fenotípicos de monócitos e células progenitoras da linhagem B. <sup>b</sup> A proteína MLL tem poder de modificar a estrutura da cromatina e o controle da expressão de genes essenciais ao desenvolvimento (como o *HOX*) <sup>c</sup>, enquanto que a proteína AML1, que é uma importante reguladora transcricional positiva, pode ser modificada para repressora transcricional nessas fusões.  
Fonte: Adaptada de Wiemels e Greaves.<sup>45</sup>



lulas leucêmicas e, assim, propiciar o manejo adequado dos indivíduos.<sup>3</sup> Entretanto, as diferenças na classificação de risco, elegibilidade (maior ou menor idade limite) e composição étnica da população ainda tornam difícil a comparação dos resultados obtidos entre os diferentes grupos de estudo.<sup>11,48</sup> Por outro lado, não devemos esquecer que, durante o curso do tratamento, são frequentes as complicações, como as infecções, em

pacientes portadores de LLA, o que também pode ter um impacto final no resultado do protocolo ou tratamento proposto. Deste modo, o trabalho adequado dos serviços de diagnóstico citogenético e molecular e a sua integração com os serviços de apoio ao tratamento, como hospitais e unidades de terapia intensiva, são fundamentais para o diagnóstico e manejo clínico adequado destes pacientes.

**TABELA 23.2**  
Frequências das anomalias citogenéticas em leucemia linfocítica aguda pediátrica e sua relevância prognóstica

Anormalidade	Frequência	Prognóstico
<b>Nenhuma (cromossomos normais)</b>	31-40%	Intermediário-bom
<b>Alterações numéricas</b>		
Hiperdiploidia (> 50 cromossomos)	23-26%	Bom
Hiperdiploidia (47-50 cromossomos)	10-11%	Intermediário
Quase triploide	1%	Bom
Quase tetraploide		Adverso
Pseudodiploidia	18-26%	Intermediário
Hipodiploidia	6%	45 cromossomos – intermediário < 45 cromossomos – intermediário/pobre*
Quase-haploide	< 1%	Pobre
Monossomia do cromossomo 7	4%	Adverso
+8	2%	Desconhecido
<b>Alterações estruturais</b>		
t(9;22)(q34;q11.2)	2-6%	Pobre
t(4;11)(q21;q23)	2%	Pobre
t(1;19)(q23;p13.3)	4-5%	Excelente/intermediário
t(12;21)(p13;q22)	20-25%	Bom em muitos estudos
9p alterado	7-11%	Adverso/não prognóstico
12p alterado	7-9%	Não prognóstico
del(6q)	6-9%	Não prognóstico
del(7p)/del(7q)	4%	Adverso
del(5q)	1%	Adverso
14q11	3-4% global ou	Não prognóstico
Amplificação iAMP21	17-22% de LLA-T	Pobre
	2%	

\*Os estudos relatam prognósticos divergentes.  
Fonte: Adaptada de Mrózek e colaboradores.<sup>47</sup>

**TABELA 23.3**  
Estimativa de sobrevida de acordo com anormalidades genéticas específicas nas células leucêmicas

Subtipo de LLA	Estimativa para cinco anos de sobrevida livre de eventos (%)
<b>Linhagem B</b>	
Hiperdiploidia > 50 cromossomos	80-90
TEL/AML1	85-90
E2A/PBX1	75-85
BCR/ABL	20-40
MLL/AF4	20-35
Hipodiploidia < 45 cromossomos	25-40
<b>Linhagem T</b>	
MLL/ENL	85-95
BCR/ABL	37
MLL/AF4	32
Agrupamento HOX11	80-90
Agrupamento TAL1	30-40
Agrupamento LYL1	30-40

Fonte: Adaptada de Pui e colaboradores.<sup>9,7</sup>

Referências

1. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Söderhäll S, Kolmannskog S, Vettenranta K, et al. Age- and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in the Nordic countries. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Oct 15;95(20):1539-44.

2. Keen-Kim D, Nooraie F, Rao PN. Cytogenetic biomarkers for human cancer. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5928-49.

3. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008 Mar 22;371(9617):1030-43.

4. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev.* 2005 Jan;81(1):123-9.

5. Kim AS, Eastmond DA, Preston RJ. Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures. *Mutat Res.* 2006 Nov-Dec;613(2-3):138-60.

6. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2003 Sep;3(9):639-49.

7. Pui CH, Relling MV, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2002 Jun;6(2):161-80.

8. Greaves M. Molecular genetics of lymphoblastic leukaemia. In: Fifth Congress of the European Haematology Association 25-28 June, 2000. Birmingham, United Kingdom; p.95-7. (EHA-5 Educational Book, June 2000).

9. McKenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem.* 2000 Aug;46(8 Pt 2):1252-9.

10. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet.* 2002 Oct 30;115(3):130-41.

11. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:102-31.

12. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.* 2007 Jan;115(1):138-45.

13. Downing JR, Mullighan CG. Tumor-specific genetic lesions and their influence on therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:118-22, 508.

14. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Apr 8;350(15):1535-48.

15. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*. 1999 Feb;35(2):173-85.
16. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jan;144(2):147-56.
17. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J*. 2000;1(1):53-66.
18. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol*. 2007 May;86(5):311-27.
19. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1986 Feb;67(2):415-20.
20. Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):593-607.
21. Mir L, editor. *Genômica*. São Paulo: Atheneu; 2004.
22. Harbott J. Cytogenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 1998 Mar;5:25-43.
23. Ferrando AA, Look AT. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2000 Oct;37(4):381-95.
24. Zen PR, Lima MC, Coser VM, Silla L, Daudt L, Fernandes MS, et al. Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004 May;151(1):68-72.
25. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jan;144(2):147-56.
26. Bloomfield CD, Mrózek K, Caligiuri MA. Cancer and leukemia group B leukemia correlative science committee: major accomplishments and future directions. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 2):3564s-71s.
27. Soulier J, Trakhtenbrot L, Najfeld V, Lipton JM, Mathew S, Avet-Loiseau H, et al. Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia*. 2003 Aug;17(8):1679-82.
28. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2001 Mar;15(1):49-59.
29. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Jul;46(7):684-93.
30. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):166-78.
31. Rubnitz JE, Look AT. Molecular genetics of childhood leukemias. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998 Jan-Feb;20(1):1-11.
32. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*. 1999 Feb;35(2):173-85.
33. Jarosová M, Holzerova M, Mihál V, Blatný J, Lakomá I, Trka J, et al. Additional evidence of genetic changes in children with ALL and TEL/AML1 fusion gene. *Leukemia*. 2002 Sep;16(9):1873-5.
34. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, et al. Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May;37(1):36-43.
35. Secker-walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J*. 1978 Dec 2;2(6151):1529-30.
36. Rowley JD. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat Rev Cancer*. 2001 Dec;1(3):245-50.
37. Stanulla M, Cario G, Meissner B, Schrauder A, Möricke A, Riehm H, et al. Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia--a perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 Sep-Oct;39(2):160-3.
38. Berger R. Cytogenetics in adult acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 1998 Mar;5:68-84.
39. Appelbaum FR. Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. *Semin Hematol*. 1999 Oct;36(4):401-10.
40. Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K, Carroll AJ, Tantravahi R, Block AW, et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3983-93.
41. Settin A, Al Haggag M, Al Dosoky T, Al Baz R, Abdelrazik N, Fouda M, et al. Prognostic cytogenetic markers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pediatr*. 2007 Mar;74(3):255-63.
42. Raynaud SD, Dastugue N, Zoccola D, Shurtleff AS, Mathew S, Raimondi SC. Cytogenetic abnormalities associated with the t(12;21):

- a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1999 Sep;13(9):1325-30.
43. Silverman LB. Acute lymphoblastic leukemia in infancy. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Dec;49(7 Suppl):1070-3.
  44. Beutler E. The treatment of acute leukemia: past, present, and future. *Leukemia*. 2001 Apr;15(4):658-61.
  45. Wiemels JL, Greaves M. Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):4075-82.
  46. Basso G, Case C, Dell'Orto MC. Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 Sep-Oct;39(2):164-8.
  47. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004 Jun;18(2):115-36.
  48. Schrappe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000 Dec;14(12):2193-4.

---

## Leitura recomendada

Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M, Pullen DJ, Camitta B. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 1998 Nov;12(11):1764-70.

## Diagnóstico citogenético da leucemia linfocítica crônica

### Definição, epidemiologia e características clínicas

A leucemia linfocítica crônica (LLC), ou linfoma linfocítico de pequenas células, pertence ao grupo das doenças classificadas como distúrbios linfoproliferativos crônicos. Ela é considerada a forma mais comum de leucemia no mundo ocidental (nos Estados Unidos e na Europa, ela é responsável por 30% dos casos de leucemia), representando uma importante causa de morbidade e mortalidade. A LLC caracteriza-se por uma anormalidade nas células maduras da linhagem linfoide, que se acumulam na medula óssea e no sangue periférico. Aproximadamente 95% dos casos de LLC são originados de células B; o restante é de células T, e uma minoria de células *natural killer* (NK). A sua classificação tem como base a morfologia, o imunofenótipo e a histologia. Atualmente, a citogenética e a genética molecular também apresentam um papel importante dentro do seu diagnóstico.<sup>1-6</sup>

Como em outras leucemias, a LLC é encontrada duas vezes mais em indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, sendo um pouco mais comum em caucasianos do que em negroides. Ela é, primariamente, uma doença de indivíduos da idade adulta tardia, com mais de 90% dos casos ocorrendo em pessoas acima dos 50 anos.<sup>2-4</sup> Ao contrário dos sinais e sintomas encontrados na leucemia aguda, na LLC eles se desenvolvem gradualmente, sendo que o início da doença é muitas vezes difícil de ser determinado. De fato, não é incomum que ela

seja descoberta acidentalmente devido a uma elevada contagem de linfócitos durante uma avaliação médica de rotina. A maioria dos pacientes apresenta, inicialmente, uma linfocitose persistente não explicada, aumento dos linfonodos (especialmente cervicais, supraclaviculares e axilares), além de esplenomegalia. Anemia e trombocitopenia leves também são comuns nos estágios precoces da doença, sendo observadas em cerca de 50 e 25% dos pacientes, respectivamente. Com a progressão da doença, ocorre a infiltração dos órgãos-alvo, o que pode levar a uma extensa adenopatia com esplenomegalia, hiperesplenismo e citopenias periféricas. Estes pacientes apresentam sintomas como febre, perda de peso e sudorese noturna. Depois, a medula óssea torna-se mais extensamente infiltrada pelas células neoplásicas, o que resulta em importante anemia, neutropenia e trombocitopenia pela extensa troca da medula óssea por células tumorais.<sup>2,4,7</sup>

Atualmente, o papel dos fatores genéticos na etiologia da LLC é bem estabelecido. Significativa agregação familiar tem sido demonstrada, mas o modo de herança ainda não é conhecido. Cerca de 10% dos pacientes com LLC apresentam ao menos um familiar em primeiro grau com a doença ou outro distúrbio linfocítico.<sup>4,5</sup>

### Avaliação citogenética em leucemia linfocítica crônica

Apesar das dificuldades da divisão celular *in vitro*, anormalidades cromossômicas não

randômicas têm sido frequentemente identificadas em LLC. Seu achado tem ajudado a apontar as vias genéticas envolvidas no processo maligno. Além disso, estas alterações apresentam associações com a histologia e subgrupos clínicos, sendo que o acúmulo de anormalidades secundárias ligadas à progressão da doença tem provido informação prognóstica adicional.<sup>1</sup>

A LLC tem sido a desordem hematológica mais difícil de ser citogeneticamente analisada. Isto ocorre devido ao seu baixo índice mitótico, pobre resposta aos mitógenos mais utilizados e problemas ainda não conhecidos na obtenção de metáfases em casos com contagens muito altas de células brancas.<sup>1,4,8</sup>

A maioria das células na LLC encontra-se na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular e acumula-se primariamente devido a uma sobrevida prolongada, decorrente de defeitos na apoptose. O pequeno número de células leucêmicas em divisão torna a análise citogenética convencional difícil, sendo que a estimulação mitótica é necessária para que se obtenha um número suficiente de metáfases.<sup>3,4</sup> Estudos iniciais relataram cariótipos normais para a maioria dos casos de LLC. Muito possivelmente isto tenha ocorrido devido ao fato de que as metáfases obtidas nestes casos originavam-se de células normais presentes em culturas de sangue ou de medula óssea.<sup>8</sup>

A identificação de um grupo de mitógenos, que primariamente estimulam de forma considerável as células B, levou a uma melhora da análise citogenética. Embora a fitoemaglutinina seja o mitógeno mais comumente utilizado, seu estímulo ocorre principalmente nas células T. Assim, células normais encontradas em desordens crônicas de células B estimuladas com a fitoemaglutinina provavelmente representem células T normais. Em um número pequeno de casos, pode ocorrer ativação das células B dependente das células T, levando à observação de anormalidades cromossômicas. Os mitógenos que mais têm provido estimulação das células B malignas são o TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13-acetat) ou forbol e o Epstein-Barr vírus (EBV).<sup>1</sup>

O TPA é o mitógeno de células B mais utilizado. Devido ao fato de as LLCs surgirem principalmente de células maduras, o tecido usualmente utilizado para estudo é o sangue

periférico. Se a medula óssea estiver disponível, culturas não estimuladas podem ser feitas e processadas para análise cromossômica. Para cultura, uma amostra de sangue periférico deve ser inicialmente coletada em um frasco com heparina (50-100 unidades/mL). Este sangue deve ser colocado em cultura logo após a coleta. Se a contagem de células brancas é alta, sua separação das demais células do sangue pode ser benéfica, pois, com isso, a população de células B é enriquecida, aumentando a chance de estimulação de um clone maligno específico. Idealmente, deve-se também realizar uma série de culturas com TPA em diferentes intervalos de tempo (por 3 e 5 dias), pois o período de resposta em cultura das células malignas varia entre os pacientes.<sup>1</sup>

Para desordens linfoproliferativas de linhagem T, um coquetel de mitógenos deve ser utilizado, pois as células T malignas são particularmente difíceis de serem estimuladas para divisão. Uma combinação com bons resultados é a de fitoemaglutinina (10 µg/mL) com o mitogênico *pokeweed*, ou PWM (20 µg/mL), e com TPA. As culturas e as preparações cromossômicas devem ser realizadas de acordo com as mesmas recomendações descritas para outros espécimes de sangue e medula óssea.<sup>1</sup>

Com estas metodologias, anormalidades cromossômicas clonais são detectadas através de técnicas de bandeamento dos cromossomos em 30 a 50% dos casos. Por sua vez, com o advento das técnicas de citogenética molecular, como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), houve um aumento na identificação destas anormalidades devido à possibilidade de o estudo ser realizado em células que não se encontram em divisão (núcleos interfásicos). Além disso, estas técnicas têm mostrado que alguns pacientes com cariótipo normal podem ser portadores de clones anormais com alterações crípticas (anormalidades cromossômicas muitas vezes pequenas, que escapam à análise convencional). A realização da FISH tem aumentado a taxa de detecção de alterações citogenéticas em LLC para cerca de 65 a 90%.<sup>3,4,6,8-10</sup> Atualmente, grupos específicos de sondas de DNA para identificação das alterações numéricas e estruturais mais frequentemente observadas em LLC já se encontram disponíveis. O painel recomendado consiste na utilização de sondas *locus*-específicas para

as regiões 6q23 (gene *C-MYB*), 11q22.3 (gene *ATM*), 11q13 (gene *CCND1*), 13q14 (D13S319), 14q32 (gene *IGH*) e 17p13.1 (gene *p53*), além de sondas centroméricas para o cromossomo 12 (D12Z3).<sup>6,10,11</sup> A **Figura 24.1** expõe as principais regiões cromossômicas envolvidas nos casos de LLC.

Embora a FISH possa apresentar vantagens sobre a citogenética convencional, sua utilidade no diagnóstico também é limitada, pois somente anormalidades conhecidas podem ser identificadas.<sup>4,11</sup> Para melhorar ainda mais o entendimento dos mecanismos patogênicos e a predição dos resultados clínicos, plataformas de microarranjos têm sido desenvolvidas como ferramentas para avaliar amplamente o genoma quanto à presença de ganhos e perdas cromossômicas. Neste sentido, a hibridização genômica comparativa (CGH) por microarranjos tem mostrado ser um teste sensível que permite a detecção de novas alterações recorrentes tanto com potencial patogênico como com importância prognóstica.<sup>10,12</sup>

Mais recentemente, o uso de novos mitógenos levou a um aumento no número de translocações detectadas pela citogenética convencional em LLC. Após a estimulação com oligonucleotídeos CpG e IL-2, o índice de anormalidades foi comparado ao detectado pelo estudo de células interfásicas pela FISH.<sup>10</sup>

Atualmente, o uso da citogenética convencional associada à FISH tem sido a abordagem de escolha para avaliar indivíduos com LLC. Os resultados de todas estas metodologias têm permitido a obtenção de melhores correlações entre alterações genéticas e achados clínico-biológicos.<sup>6</sup>

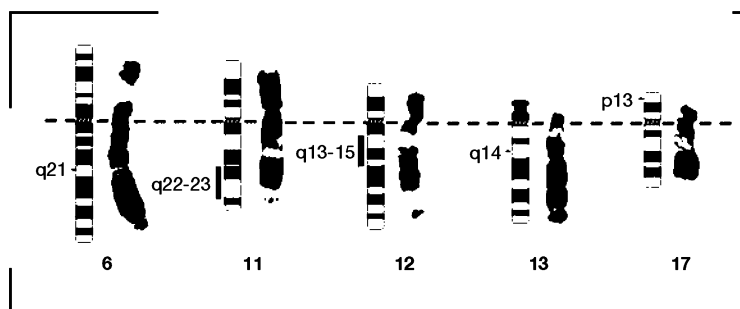
## Alterações cromossômicas em leucemia linfocítica crônica

Algumas anormalidades citogenéticas relatadas em LLC relacionam-se ao seu processo de iniciação, enquanto outras parecem ter correlações clínicas e implicações prognósticas distintas. Estas alterações, em geral, parecem ser secundárias a eventos envolvidos na progressão da doença. Pacientes com cariótipos complexos com presença de mais de três anormalidades, por exemplo, em geral mostram uma forma mais agressiva da doença.<sup>1,4</sup>

A frequência de anormalidades específicas vai depender não só da situação clínica em que o paciente se encontra como da técnica citogenética de detecção utilizada.<sup>10</sup> Alterações cromossômicas encontradas em LLC consistem, em geral, de deleções e/ou amplificações. As translocações eram consideradas raras; contudo, estudos mais recentes, utilizando novos mitógenos, têm relatado incidências destes rearranjos superiores a 34%. Entre os pacientes com cariótipo anormal, cerca de 65% apresentam uma única anormalidade cromossômica; 25%, duas, e o restante, alterações mais complexas (6%).<sup>4,6</sup> As principais anormalidades cromossômicas identificadas em LLC são resumidas a seguir (ver também **Tabela 24.1**).

### Anormalidades de 13q

Rearranjos envolvendo 13q usualmente envolvem a região 12-14. Deleções da mesma



**Figura 24.1**

Ideograma e cariótipo parcial por bandas GTG (resolução de cerca de 400 bandas) mostrando as regiões cromossômicas frequentemente envolvidas em LLC.

região têm sido relatadas em cerca de 10% dos casos de LLC avaliados pela citogenética convencional. Contudo, a maioria não é detectada por esta análise, sendo que a frequência de deleções aumenta para 36 a 53% quando se utiliza a técnica de FISH. As deleções de 13q14 frequentemente são as únicas anormalidades cromossômicas observadas. Elas também representam as alterações clonais mais precoces, sugerindo que a perda ou a inativação de um gene supressor tumoral presente na região possa ser crucial para o desenvolvimento da LLC. É interessante notar que existe uma correlação negativa entre a trissomia do cromossomo 12 e a deleção de 13q, sugerindo dois mecanismos independentes de leucemogênese.<sup>1,4,9</sup>

Anormalidades de 11q

Alterações estruturais, como deleções e translocações, envolvendo o cromossomo 11 são consideradas o evento genético recorrente mais comum em uma variedade de desordens linfoproliferativas. Estas desordens têm sido encontradas em 9 a 15% dos pacientes com LLC avaliados pela citogenética convencional e em 10 a 32% daqueles analisados por FISH.

A região mais frequentemente deficiente envolve o braço longo (q) do cromossomo 11, entre as bandas 22 e 23.<sup>1,3,4,9</sup>

Anormalidades de 17p

A perda de material genético do cromossomo 17 em LLC geralmente envolve o braço curto (p), em especial a região 13.<sup>4</sup> Deleções e translocações acometendo esta região raramente são detectadas por citogenética convencional (< 5% dos casos). Pela FISH, elas têm sido verificadas em 10 a 27% dos pacientes.<sup>3,9</sup>

Trissomia do cromossomo 12

A trissomia do cromossomo 12 é considerada a anormalidade numérica mais comum em LLC, estando presente em cerca de 11 a 21% dos casos (Figura 24.2). Embora ocorra em outros distúrbios linfoproliferativos, ela é característica da LLC. A trissomia 12 tanto pode ser a única anormalidade identificada como estar associada com outras alterações, como a deleção de 6q e de 13q14. Atualmente, a análise de células interfásicas pela técnica de FISH com sondas centroméricas para o cro-

**TABELA 24.1**  
Principais anormalidades citogenéticas observadas em LLC, com os respectivos genes envolvidos e sua frequência de detecção de acordo com a metodologia empregada

Cromossomo	Anormalidade	Genes envolvidos	Frequência (%) *	
			Cariótipo	FISH
13	del13q14	Rb1, Leu-1, Leu-2, Leu-5, CLLD6-CLLD8, KPNA3, miR15 e miR16	10	36-53
11	del11q22-23	FDX, ATM, MLL, PZLF, Mre11, RDX, NPAT, CUL5 e PPP2R1B	9-15	10-32
17	del17p13	p53	< 5	10-27
12	+12	CDK2, CDK4, STAT6, APAF-1, MDM-2 e CCLU1	11-21	16-40
6	del6q	?	4-6	2-9
TOTAL			40-50	65-90

\*Estas frequências são diretamente dependentes do estágio da doença, da técnica citogenética de detecção utilizada e se a LLC é ou não resistente à terapia convencional.  
Fonte: Adaptada de Harrison,<sup>1</sup> Naeem,<sup>2</sup> Ripollés e colaboradores,<sup>3</sup> Inandar e Bueso Ramos,<sup>4</sup> Keen-Kin e colaboradores,<sup>6</sup> Moreno e Montserrat,<sup>9</sup> Zens e colaboradores<sup>10</sup> e Gowda e Byrd.<sup>11</sup>



mosso 12 tem-se tornado o método mais utilizado para a detecção desta alteração. Esta técnica é altamente sensível e tem revelado um número maior de casos positivos de trissomia 12 do que a análise cariotípica (16 a 40% dos casos).<sup>1,3,4,9</sup>

## Deleção de 6q

As deleções de 6q observadas em LLC envolvem os mesmos pontos de quebra descritos nos linfomas malignos.<sup>1</sup> A partir da análise cariotípica, aproximadamente 4 a 6% dos casos apresentam deleções desta região. Esse índice aumenta para 9% quando a avaliação é realizada pela técnica de FISH.<sup>4,9</sup> Embora encontrada em LLC, esta anormalidade é um marcador real para malignidade linfóide em geral e não está preferencialmente associada com tipos específicos de doença.<sup>1</sup>

## Outras alterações

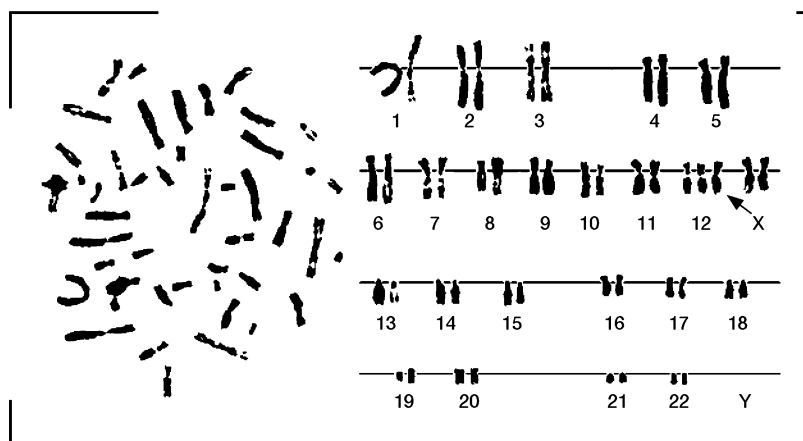
Em geral, translocações recíprocas são incomuns em LLC. Contudo, mais recentemente, a estimulação das células LLC, tanto com células ligantes com expressão CD40 e IL-4 tanto com uma combinação de oligodesoxinucleotídeos CpG e IL-2, tem levado a um aumento na frequência de detecção de translocações em pacientes com LLC (até 34%).<sup>9,10</sup> Anormalidades do cromossomo 14 vêm sendo observadas em cerca de 6 a 16% dos casos. Elas geralmente envolvem a banda q32, onde se localiza o gene da cadeia pesada

de imunoglobulina (IGH), e são comumente associadas a outras anormalidades cariotípicas. Translocações, mais do que deleções ou amplificações, têm sido relatadas envolvendo esta região.<sup>4</sup>

Com os avanços na citogenética molecular, pelo desenvolvimento de técnicas como a CGH, outras alterações também têm sido identificadas. Elas incluem ganho de número de cópias do cromossomo 19 e do oncogene *MYCN*, localizado em 2p24.<sup>10</sup>

## Significado clínico e prognóstico das anormalidades citogenéticas em leucemia linfocítica crônica

Embora o diagnóstico de LLC em geral seja simples de se fazer, a doença é caracterizada por um curso clínico altamente variável. Alguns pacientes não apresentam sintomas ou apresentam poucos sintomas, e podem ter uma expectativa de vida normal, enquanto outros progridem precocemente e podem ir a óbito devido à doença.<sup>10</sup> Idade, sexo e estadiamento clínico têm sido identificados como importantes fatores prognósticos independentes. A contagem de linfócitos no sangue periférico, o tempo de duplicação linfocítica, a histologia da medula óssea e os níveis séricos de timidina-quinase e microglobulina  $\beta$ -2 são outros parâmetros relevantes. O tratamento



**Figura 24.2**

Placa metafásica e cariótipo de um caso de LLC mostrando a presença de trissomia do cromossomo 12 (seta).

tem sido tradicionalmente utilizado para estágios avançados ou em casos de doença sintomática. Mais recentemente, abordagens altamente efetivas e potencialmente curativas, como a combinação de anticorpos com quimioterapia e o transplante de células-tronco alogênicas, têm sido desenvolvidas e utilizadas em LLC. Os diagnósticos moleculares têm ajudado muito no progresso do entendimento da patogênese da doença, bem como melhorado a predição da evolução dos pacientes. Mais recentemente, marcadores moleculares e celulares têm sido descobertos e alguns deles têm sido utilizados para estratificar pacientes para as diferentes opções de tratamento.<sup>3,10</sup>

Anormalidades citogenéticas específicas têm provido algumas visões sobre a patogênese da LLC por apontar genes candidatos (como o *p53*, em 17p13, e o *ATM*, em 11q22-q23), enquanto que para outros *loci*, como o 13q, o papel preciso de possíveis supressores tumorais ainda não foi completamente elucidado. Em adição, certas alterações têm sido consideradas fatores preditores associados com características da doença, como marcada linfadenopatia (deleção de 11q) e resistência ao tratamento com quimioterapia convencional (deleção de 17p), salientando a importância das alterações cromossômicas no curso da LLC.<sup>4,6,10</sup>

Assim, a citogenética tem sido útil para prever o curso clínico da LLC. As anormalidades cromossômicas são consideradas fatores preditores independentes da progressão da doença e da sobrevida, sendo que uma classificação hierárquica das anormalidades tem sido definida. Pacientes com cariótipos diploides ou com somente deleção de 13q têm um curso clínico benigno e melhor prognóstico. A presença de deleção de 6q ou trissomia do cromossomo 12 usualmente tem um efeito adverso na sobrevida do paciente e resulta em um prognóstico intermediário. Pacientes com alterações em 11q22-23, deleção de 17p13 ou cariótipos complexos têm um pior prognóstico.<sup>3,6,10,11</sup> As informações clínicas e prognósticas associadas a estas anormalidades cromossômicas encontram-se descritas em maiores detalhes a seguir (ver também **Tabela 24.2**).

## Deleções de 13q

Pacientes com somente deleção de 13q apresentam um bom prognóstico e um curso

clínico benigno. Sua sobrevida média varia de 79 a 133 meses.<sup>3,6,8</sup>

## Trissomia do cromossomo 12

Existe uma forte correlação entre a trissomia 12 e alterações morfológicas em LLC. A trissomia 12 usualmente possui um excesso de grandes linfócitos, o que identifica a variante de LLC de células mistas da classificação franco-americana-britânica (FAB). Ela também está relacionada a uma atividade proliferativa alta, sendo que a proporção de células com trissomia 12 aumenta com a progressão da doença. De forma geral, pacientes com esta trissomia apresentam uma doença em estágio avançado, um prognóstico intermediário e índices médios de sobrevida significativamente menores quando comparados àqueles de indivíduos com um cariótipo normal (sobrevida média de 33 a 114 meses). Entretanto, quando o grupo da trissomia 12 é subdividido em pacientes nos quais ela é a única anormalidade e naqueles com alterações adicionais, tem-se observado que o primeiro grupo apresenta um melhor prognóstico.<sup>1,3,4,6</sup>

## Deleção de 6q

A deleção de 6q representa uma entidade citogenética e clínico-biológica que exibe um perfil fenotípico e hematológico distinto. Pacientes com deleção de 6q usualmente apresentam achados morfológicos e imunofenotípicos associados com uma progressão para uma leucemia prolinfocítica mais agressiva. Deste modo, pacientes com deleção de 6q requerem terapia imediata para adquirirem remissão. Estes pacientes têm sido enquadrados com um risco intermediário, sendo que possuem uma sobrevida média de 33 a 114 meses.<sup>3,6</sup>

## Deleção de 11q

A deleção de 11q tem sido associada clinicamente a uma doença progressiva com um prognóstico pobre. Pacientes com esta deleção são mais jovens, têm a doença em um estágio clínico mais avançado, apresentam linfadenopatias abdominal e mediastinal mais extensas, aceleração da velocidade de duplica-

ção dos linfócitos e uma diminuição significativa da sobrevida média, de 13 a 79 meses. A demonstração de uma deleção em 11q23 é um dos parâmetros citogenéticos mais importantes para o prognóstico em LLC.<sup>4,5</sup>

Anormalidades de 17p

A deleção de 17p é considerada o fator preditor mais importante de progressão da doença e de uma sobrevida curta (sobrevida média de 9 a 32 meses), sendo frequentemente observada em estágios avançados da LLC.<sup>4,5</sup> Um limiar de 20% de células apresentando deleção de 17p separa pacientes com um prognóstico pobre e bom, respectivamente.<sup>9</sup> Embora o grupo de pacientes com deleção de 17p seja pequeno em estágios precoces, sua detecção é de grande importância devido ao fato de possuírem poucas chances de responder à quimioterapia de primeira linha com agentes

alquilantes e análogos da purina.<sup>4</sup> Assim, a deleção de 17p é o primeiro marcador biológico a se tornar incorporado no risco estratificado em abordagens de tratamento de primeira linha em LLC. Existe um consenso crescente de que a análise citogenética pela técnica de FISH deveria ser obtida ao menos para avaliação quanto à presença de deleção de 17p em todo paciente antes da escolha da terapia. Casos com deleção de 17p são responsáveis por uma proporção significativa de pacientes refratários também ao tratamento com a fludarabina. Contudo, não são todos os casos de LLC refratários a esta medicação que mostram uma citogenética de alto risco, sugerindo que a identificação de novos marcadores possa auxiliar no manejo dos pacientes.<sup>7,10</sup>

Mais recentemente, a identificação de novos rearranjos cromossômicos pela citogenética convencional, muitos deles compostos de translocações, ocorrida devido à utilização de

**TABELA 24.2**  
Anormalidades cromossômicas em LLC e sua correlação com as características clínicas, a sobrevida média e o prognóstico apresentados pelos pacientes

Anormalidade	Características clínicas	Sobrevida média (em meses)	Prognóstico
del13q14	Estágio de Binet precoce com estado mutacional IgVH favorável e baixa taxa de progressão da doença.	79 a 133	Bom
+12	Morfologia e imunofenótipos atípicos com elevada citomorfologia; diferenciação linfoplasmocitoide; expressão mais intensa de CD20; desvio imunofenotípico de CD5-, positividade de FMC7 e alta frequência de expressão de CD38.	33 a 114	Intermediário
del6q	Contagem de células brancas no sangue relativamente elevada; imunofenótipo clássico e CD38+; morfologia atípica e incidência intermediária de hipermutação somática IgVH.	33 a 114	Intermediário
del11q22-23	Doença avançada, com rápido tempo de duplicação dos linfócitos; esplenomegalia e extensa linfadenopatia abdominal, mediastinal e periférica (em especial na del11q); IgVH em estado não mutado; níveis séricos elevados de desidrogenase láctica e de fosfatase alcalina, e baixos de albumina.	13 a 79	Pobre
del17p13		9 a 32	Pobre

Fonte: Adaptada de Harrison,<sup>1</sup> Naeem,<sup>2</sup> Ripollés e colaboradores,<sup>3</sup> Inandar e Bueso Ramos,<sup>4</sup> Zent e Kay,<sup>5</sup> Keen-Kin e colaboradores,<sup>6</sup> Moreno e Montserrat,<sup>9</sup> Zens e colaboradores<sup>10</sup> e Gawda e Byrd.<sup>11</sup>

novos mitógenos como os oligonucleotídeos CpG e IL-2, tem definido um novo subgrupo de prognóstico, com uma aparente menor sobrevida.<sup>10</sup> Os casos de translocação t(14;19) (q32;q13) estão associados com morfologia linfocítica e imunofenótipo atípicos. Em adição, estes pacientes apresentam uma doença em uma idade mais precoce e com uma rápida progressão; entretanto, ainda faltam estudos que acessem os reais efeitos desta anormalidade sobre o prognóstico e a sobrevida dos pacientes.<sup>4,8</sup>

Assim, embora a FISH e as demais técnicas moleculares estejam sendo utilizadas cada vez mais na detecção de alterações cromossômi-

cas, a citogenética convencional permanece como uma ferramenta vital na identificação de interações cromossômicas em cariótipos complexos e na descoberta de novas anormalidades recorrentes com significância prognóstica.<sup>1</sup> O uso conjunto destas técnicas tem sido útil também para investigação de doença residual mínima, detecção de alterações genômicas adquiridas durante o curso da doença (descritas em 17% dos casos de LLC) e possível indicação de potenciais sítios-alvo para intervenções terapêuticas.<sup>9</sup> Estudos futuros com trabalhos prospectivos possivelmente levarão a um melhor entendimento da doença e identificação de novos subgrupos de prognóstico.

## Referências

1. Harrison CJ. The lymphomas and chronic lymphoid leukaemias. In: Rooney DE, editor. Human cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 87-109.
2. Naeem RC. Cytogenetics of hematologic neoplasms. In: Gersen SL, Keagle MB, editors. The principles of clinical cytogenetics. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 365-420.
3. Ripollés L, Ortega M, Ortuño F, González A, Losada J, Ojanguren J, et al. Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Nov;171(1):57-64.
4. Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diagn Pathol*. 2007 Oct;11(5):363-89.
5. Zent CS, Kay NE. Chronic lymphocytic leukemia: biology and current treatment. *Curr Oncol Rep*. 2007 Sep;9(5):345-52.
6. Keen-Kim D, Nooraie F, Rao PN. Cytogenetic markers for human cancer. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:5928-49.
7. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:163-83.
8. Campbell LJ. Cytogenetics of lymphomas. *Pathology*. 2005 Dec;37(6):493-507.
9. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2008 Jul;22(4):211-9.
10. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia – pathogenetic and clinical implications. *Leuk Lymphoma*. 2008 May;49(5):864-73.
11. Gowda A, Byrd JC. Use of prognostic factors in risk stratification at diagnosis and time of treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2006 Jul;13(4):266-72.
12. Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma*. 2005 Sep;114(4):286-94.

## Diagnóstico citogenético dos linfomas malignos

### Definição, epidemiologia e características clínicas

Os linfomas são neoplasias hematológicas frequentes e representam a terceira causa de câncer na infância. A maior parte dos pacientes com linfoma apresenta sintomas iniciais como aumento de linfonodos e/ou sintomas sistêmicos, como febre, sudorese noturna, perda de peso ou fadiga. Menos frequentemente, eles apresentam sintomas secundários aos efeitos do linfoma em órgãos críticos, como a medula óssea, o fígado e os rins. Devido à falta de especificidade dos achados, muitos meses podem se passar até que o diagnóstico da neoplasia seja considerado. Em algumas situações, o aumento de linfonodos e a esplenomegalia podem ser achados encontrados incidentalmente durante a avaliação médica.

Para o estabelecimento do diagnóstico do linfoma, necessita-se, além de uma história clínica e um exame físico detalhados, da realização de um aspirado de medula óssea com biópsia. Estes, ainda, devem ser analisados por um patologista experiente, que classificará a medula como estando envolvida pelo linfoma ou não. Caso exista associação da neoplasia com a medula, o subtipo histológico do linfoma deve ser observado devido à possibilidade de uma histologia discordante. Adicionalmente, a avaliação pela imuno-histoquímica pode ajudar a distinguir infiltrados benignos de linfomatosos, e a citometria de fluxo pode detectar envolverimentos mínimos do linfoma.<sup>1,2</sup>

A classificação dos linfomas é um objeto de discussão desde a sua descoberta. Do relato original de Thomas Hodgkin, em 1832, até o início do século XX, diversas entidades clínicas foram nomeadas e descritas. Elas apresentavam uma linguagem variável e imprecisa, indo de sarcoma de células reticulares a linfossarcoma. As primeiras tentativas de classificar sistematicamente os linfomas surgiram pela década de 1930, e baseavam-se mais na sua morfologia, isolada ou em combinação com informações clínico-patológicas. Estes esforços levaram em parte à classificação de Rappaport, que foi o primeiro sistema a incorporar o prognóstico. Desde então, muitas alterações foram propostas, sendo que, atualmente, a classificação mundialmente aceita é a da Organização Mundial da Saúde (OMS), que se baseia na morfologia e no imunofenótipo do linfoma. Nela, a distinção principal se dá pelo tipo da célula de origem: célula B, T, ou *natural killer* (NK). Depois, os linfomas são classificados como derivados de células precursoras ou de linfócitos maduros. Hoje em dia, mais de 30 tipos de linfomas são conhecidos (ver **Tabela 25.1**). Eles apresentam um comportamento clínico que varia de bastante indolente a profundamente agressivo. Nos Estados Unidos, estima-se que a cada ano sejam realizados cerca de 8.200 novos diagnósticos de linfoma de Hodgkin (LH) e 63.200 de linfoma não Hodgkin (LNH). No entanto, é importante estar ciente de que a distribuição dos subtipos de LNH varia pelo mundo. Por exemplo, o subtipo folicular de linfoma é responsável por 31% dos casos de

LNH em Vancouver (Canadá) e por somente 8% daqueles em Hong Kong.<sup>2-6</sup>

Um diagnóstico preciso é essencial. Deste modo, o passo inicial é a realização de uma biópsia para a obtenção adequada de material. Entretanto, a classificação do diagnóstico proposta pela OMS é realizada não apenas pelo critério morfológico, mas também com a incorporação de dados da imunofenotipagem

e, em alguns casos, genéticos. Assim, atualmente o seu diagnóstico se dá pela associação dos achados clínicos, histopatológicos e genéticos.<sup>5</sup>

O estadiamento clínico dos linfomas deriva do sistema de Ann Arbor (AA). Este sistema foi originalmente desenvolvido para o LH, tendo sido subsequentemente modificado no encontro de Cotswolds, em 1989. Ele se ba-

**TABELA 25.1**  
Esquema de classificação dos linfomas da OMS

Leucemias/linfomas de células B
Linfoma/leucemia de precursores de células B Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico Leucemia prolinfocítica de células B Linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldenström Linfoma da zona marginal esplênica Tricoleucemia Plasmocitoma/mieloma de plasmócitos Linfoma da zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa (MALT) Linfoma da zona marginal linfonodal Linfoma folicular Linfoma de células do manto Linfoma difuso de grandes células B Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico) Linfoma primário de efusões Linfoma/leucemia de Burkitt
Leucemias/linfomas de células T e células <i>natural killer</i> (NK)
Linfoma/leucemia linfoblástica de células pré-T Leucemia prolinfocítica de células T Linfoma de células NK blásticas Leucemia linfocítica de grandes células T granulares Leucemia agressiva de células NK Leucemia/linfoma de células T do adulto (HTLV1+) Linfoma de células T/NK extranodal, do tipo nasal Linfoma de células T do tipo enteropático Linfoma de células T hepatoesplênico Linfoma cutâneo de células T, do tipo paniculite subcutânea Micose fungoide/síndrome de Sézary Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas Linfoma de células T angioimunoblástico Linfoma de células T periférico, não especificado Linfoma primário sistêmico Linfoma de grandes células anaplásicas
Linfoma de Hodgkin
Nodular com predomínio linfocítico Linfoma de Hodgkin clássico Esclerose nodular Celularidade mista Depleção linfocítica Rico em linfócitos

Fonte: Adaptada de Paes e colaboradores<sup>3</sup> e Matasar e Zelenetz.<sup>5</sup>

seia, principalmente, na extensão do envolvimento dos grupos nodais.<sup>5</sup>

## Etiologia

Numerosos fatores têm sido relacionados a um risco aumentado para certos tipos de linfoma. Estes fatores incluem infecção crônica, imunossupressão e história familiar para neoplasias hematológicas como a leucemia linfocítica crônica e o próprio linfoma. Está claro que a infecção crônica pode levar à gênese do linfoma, tanto pelos efeitos diretos de alguns vírus [(como o Epstein-Barr vírus [EBV], o vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 [HTLV-1] e o herpes vírus humano do tipo 8 [HHV8]), como pela estimulação crônica do sistema imune – como na gastrite pela *Helicobacter pylori* e o vírus da hepatite C. Doenças autoimunes, como a artrite reumatoide e a síndrome de Sjögren, também podem aumentar o risco de linfoma através da estimulação crônica do sistema imune, dando origem a clones de células B desreguladas. A imunossupressão pode se dar tanto por infecções, como ocorre em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), como pelo uso de medicamentos imunossupressores (após transplante de órgãos sólidos, p. ex.). Risco adicional é associado a alguns fatores ambientais, como radiação ionizante (incluindo a luz solar) e pesticidas agrícolas. Claramente, estes agentes, sejam eles infecciosos, inflamatórios ou tóxicos, interagem com o genoma do hospedeiro de forma complexa, levando à gênese do linfoma. Além disso, tem sido estabelecido um risco hereditário de linfoma, sendo que a chance de desenvolver LH é aumentada para parentes em primeiro grau de pacientes com o tumor. Contudo, atualmente não existe um teste genético específico disponível para avaliar tanto o paciente como seus familiares.<sup>2,4,5</sup>

Durante a última década, houve um significativo progresso na elucidação da patogênese dos linfomas. Muitas anormalidades citogenéticas frequentemente associadas com estes tumores vêm sendo caracterizadas em nível molecular, levando à identificação de um grande número de genes. O papel da maioria destas alterações na gênese do tumor também tem sido confirmado em modelos experimen-

tais com animais transgênicos. Por outro lado, a maioria destas alterações genéticas associa-se, seletivamente, a alguns tipos específicos de linfoma, representando assim marcadores com possível significância diagnóstica e, até mesmo, prognóstica.<sup>7-9</sup>

## Anormalidades citogenéticas em linfomas

Mais recentemente, estudos citogenéticos e moleculares têm melhorado a acurácia diagnóstica e identificado subtipos histológicos de linfomas com prognósticos distintos. Além disso, têm atuado também como um guia para a identificação de genes aparentemente responsáveis pelo desenvolvimento dos linfomas.

O teste citogenético padrão e mais utilizado para a análise dos linfomas é o cariótipo convencional. Embora seja possível cultivar células do linfoma a partir de qualquer lugar, incluindo a medula óssea, estudos citogenéticos deste tumor usualmente baseiam-se na análise de amostras de linfonodos. Para melhores resultados, uma porção do linfonodo deve ser transportada em meio de cultura (RPMI 1640) estéril ao laboratório de citogenética o mais breve possível após a excisão. O linfonodo é mecanicamente desagregado para produzir uma suspensão de células que é adicionada ao meio de cultura. A cultura curta em RPMI 1640 suplementada com 10 a 20% de soro fetal bovino tem sido indicada por vários grupos como sendo aquela com melhores resultados.

O estudo pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (ver Capítulo 28), por sua vez, possibilita a detecção de alterações genéticas em casos nos quais a citogenética convencional não é informativa. Praticamente, qualquer DNA genômico pode ser utilizado como sonda. Esta sonda pode ser aplicada tanto a núcleos interfásicos como a placas metafásicas. Três tipos gerais de sondas de DNA atualmente estão disponíveis para análise por FISH em linfomas:

1. Sondas centroméricas: hibridizam-se a centrômeros de cromossomos específicos, em sequências satélites-alvo presentes na heterocromatina. Elas permitem determinar o número de cada cromossomo;



- 2. Sondas de pintura cromossômica: são coleções de sequências de DNA que abrangem todo o comprimento de um determinado cromossomo. Elas permitem a identificação de rearranjos complexos que não podem ser determinados pela citogenética convencional, além de revelar translocações crípticas (alterações menores que também passam despercebidas na análise cariotípica). No entanto, estas sondas não são úteis para detectar rearranjos em células interfásicas, pois a forma não condensada dos cromossomos observada na intérfase produz um sinal extremamente difuso e pouco informativo;
- 3. Sondas *locus*-específicas: hibridizam-se a sequências específicas e são utilizadas para identificar translocações e deleções.<sup>7</sup>

A **Tabela 25.2** lista uma série de sondas de DNA disponíveis para o estudo citogenético dos linfomas pela técnica de FISH.

A técnica de FISH também pode ser realizada em secções de tecido tumoral emblocadas em parafina através da hibridização direta tanto a cortes finos de tecido como a células obtidas a partir de secções mais espessas.

A FISH multicolorida (M-FISH) ou a cariotipagem espectral (SKY) combinam a visão global do genoma, obtida através da citogenética convencional, com a técnica de FISH. Estas técnicas se utilizam de sondas de pintura que marcam todos os cromossomos, de tal forma que a origem cromossômica de todos os rearranjos pode ser mais bem demonstrada. Como estas técnicas se baseiam na pintura dos cromossomos, elas não são aplicáveis a células interfásicas. Elas têm se mostrado úteis na identificação de translocações crípticas e na elucidação de rearranjos complexos.

Ao contrário da M-FISH ou SKY, a hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization*, ou CGH) não requer preparações metafásicas da amostra em estudo para acessar alterações genômicas. Ela permite uma avaliação ampla do genoma, com verificação de ganho ou perda de número de cópias de sequências de DNA em células tumorais, pela comparação com DNA de células normais. O DNA da célula tumoral é extraído das amostras do paciente e diretamente marcado pela incorporação de nucleotídeos conjugados a fluorocromos (em geral, fluoresceína, que tem fluo-

**TABELA 25.2**  
Sondas de FISH disponíveis para identificar rearranjos cromossômicos específicos em linfomas

Anormalidade cromossômica	Sondas de FISH disponíveis	Subtipo de linfoma
t(8;14)(q24;q32)	MYC/IGH; MYC BA	LB; LDGCB; LF; LCM
t(2;8)(p11;q24)	MYC BA	LB; LDGCB; LF
t(8;22)(q24;q11)	MYC BA	LB; LDGCB; LF
t(14;18)(q32;q21)	IGH/BCL2	LF; LDGCB
t(3;V)(q27;V)	BCL6 BA	LDGCB; LF
t(11;18)(q21;q21)	AP12/MALT1; MALT1 BA	MALT
t(14;18)(q32;q21)	MALT1 BA	MALT
t(11;14)(q13;q32)	CCND1/IGH	LCM
t(2;V)(p23;V)	ALK BA	Linfomas de grandes células anaplásicas
Alterações numéricas como trissomia dos cromossomos 3, 5 e 12	Todas as sondas centroméricas disponíveis	Todos subtipos

BA: indica uma sonda *break-apart*, ou seja, na presença de uma translocação os sinais fusionados das sondas que se hibridizam lado a lado irão se separar em dois sinais individuais;  
V: indica que os cromossomos parceiros envolvidos nas translocações com 3q27 variam;  
LB: linfoma de Burkitt; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LF: linfoma folicular; LCM: linfoma de células do manto; MALT: linfoma de zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa.  
Fonte: Adaptada de Campbell.<sup>7</sup>



rescência verde). Uma quantidade equivalente de DNA de um controle é marcada com um fluorocromo diferente (em geral, *Texas red*, que apresenta fluorescência vermelha). Os dois DNAs marcados são misturados e hibridizados a cromossomos metafásicos humanos normais. A captura dos sinais de hibridização de ambos os fluorocromos, em cada par cromossômico, e a comparação da intensidade de hibridização de cada um dos sinais (verde e vermelho) por um programa de análise apropriado permitem a identificação de regiões com provável ganho e perda de material genético na amostra neoplásica. Mais recentemente, o desenvolvimento da técnica de CGH por microarranjos aumentou consideravelmente a detecção de anormalidades menores, que escapavam à resolução alcançada pela CGH.<sup>7</sup>

Quanto às alterações citogenéticas observadas, o ganho de um cromossomo essencialmente resulta em amplificação gênica. Perda de todo ou de parte de um cromossomo pode resultar em perda da heterozigose. Rearranjos, como translocações, podem levar à justaposição de sequências de genes localizadas em diferentes cromossomos e, consequentemente, alterar a regulação transcricional de um oncogene ou criar um gene quimérico pela fusão de sequências codificantes dos dois genes envolvidos.<sup>10</sup>

É importante estar ciente de que a frequência de detecção das anormalidades citogenéticas em linfoma, como vimos pela própria descrição das diferentes técnicas, é diretamente relacionada ao método utilizado. Investigações iniciais baseavam-se na análise pelo cariótipo convencional. Contudo, mais recentemente, a evolução das ferramentas de citogenética molecular, com o desenvolvimento de técnicas como FISH, SKY e CGH, tem aumentado consideravelmente o espectro de detecção destas alterações.<sup>7</sup>

## Alterações cromossômicas de acordo com o subtipo de linfoma

A primeira anormalidade citogenética a ter seus segredos revelados foi a translocação t(8;14), que caracteriza o linfoma de Burkitt (LB), descrita por Zech e colaboradores<sup>11</sup> em 1976. Desde aquela época, um grande número de anormalidades cromossômicas e genéticas

tem sido detectado em linfomas. A seguir, veremos as alterações mais frequentemente descritas de acordo com o subtipo celular de linfoma.

### *Linfomas de células B*

Para entender os rearranjos observados nos linfomas de células B, é importante compreender os eventos que ocorrem no desenvolvimento e na maturação normais das células B. Estes eventos incluem a recombinação genética de segmentos variáveis do gene do receptor de células B em estágios precoces na medula óssea, além de recombinações e introdução de mutações somáticas em genes destes receptores durante a reação do centro germinal. A ocorrência fisiológica de remodelamento do DNA durante o desenvolvimento das células B leva a um risco de introdução acidental de alterações genéticas. Como consequência, muitos subtipos de linfomas de células B se caracterizam pela presença de translocações recíprocas envolvendo genes de imunoglobulina, tais como:

- *IGH*: gene da imunoglobulina de cadeia pesada, localizado em 14q32;
- *IGK*: gene da imunoglobulina de cadeia leve  $\kappa$ , localizado em 2p12; e
- *IGL*: gene da imunoglobulina de cadeia leve, localizado em 22q11.2.

A justaposição de regiões promotoras destes genes de imunoglobulina com outros proto-oncogenes leva a um aumento da função dos últimos e ao desenvolvimento de linfoma.<sup>8,12</sup>

Como colocado anteriormente, o LB caracteriza-se pela translocação t(8;14)(q24;q32) (ver **Figura 25.1**). Esta translocação é observada em cerca de 80% dos casos e foi a primeira a ter os genes envolvidos identificados em linfomas. Sua detecção é realizada, usualmente, pela citogenética convencional. Em um número menor de casos de LB observam-se as translocações alternativas t(8;22)(q24;q11) (15%) e t(2;8)(p12;q24) (5%).<sup>7,8,10,12</sup>

Em relação ao linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), uma grande variedade de anormalidades cromossômicas tem sido observada, o que reflete claramente um gru-

po geneticamente heterogêneo de linfomas. Estas incluem translocações como  $t(14;18)$  ( $q32;q21$ ),  $t(8;14)$  ( $q24;q32$ ),  $t(8;22)$  ( $q24;q11$ ),  $t(3;14)$  ( $q27;q32$ ) e  $t(3;22)$  ( $q27;q11$ ), além de outros rearranjos envolvendo  $14q32$ . A  $t(14;18)$  ( $q32;q21$ ) tem sido observada em aproximadamente 20% dos casos. Translocações envolvendo a região  $q27$  do cromossomo 3 também são comuns (30 a 40% dos casos). Estudos por citogenética molecular têm identificado *loci* frequentemente envolvidos, como  $6q11-15$ ,  $18q21$ ,  $1q11-21$ ,  $3q27$  e  $9p13$ . As amplificações dos genes *REL*, *MYC* e *BCL2* são encontradas em cerca de 20% dos casos, sendo que a presença de pelo menos um cromossomo 12 adicional também é um achado comum no LDGCB.<sup>7,8,10,13</sup>

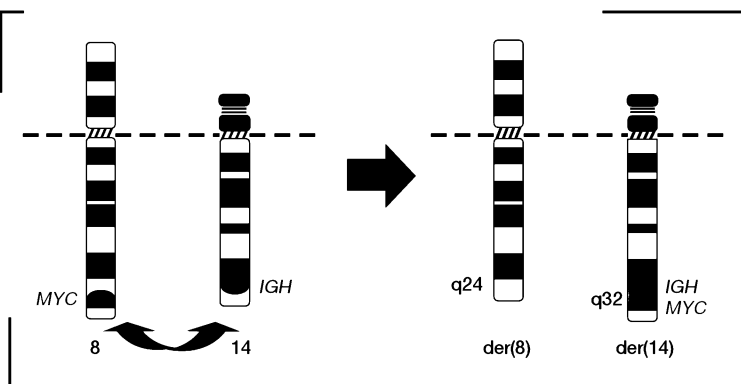
Por sua vez, o linfoma folicular (LF) é um dos subtipos mais comuns de LNH. As células do LF localizam-se no centro germinativo, e em 80 a 90% dos casos contêm a característica  $t(14;18)(q32;q21)$ . Translocações variantes, como a  $t(2;18)(p12;q21)$  e a  $t(18;22)(q21;q11)$ , também têm sido descritas. As alterações numéricas secundárias mais frequentes incluem a presença de um cromossomo X adicional e trissomias dos cromossomos 7, 12 ou  $12q$  e 18 ou  $18q$ . Anormalidades estruturais frequentemente envolvem as regiões cromossômicas  $1p$ ,  $6q$  e  $10q$ .<sup>7,8,10,11</sup>

No linfoma linfocítico, ou leucemia linfocítica crônica, a trissomia do cromossomo 12 tem sido observada em 44% dos casos atípicos. As anormalidades de  $11q$  e  $13q$  são as mais frequentes na forma clássica. De um modo geral, translocações recíprocas são incomuns neste tipo de linfoma.<sup>7,10,12,13</sup>

Três formas clínico-patológicas distintas de linfoma de células B da zona marginal (LCBZM) têm sido descritas: extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa (MALT), esplênico e linfonodal, sendo que todos os três apresentam padrões diferentes de anormalidades cromossômicas. Os linfomas MALT são caracterizados por trissomias dos cromossomos 3, 12 e/ou 18, além de uma série de translocações recíprocas. A  $t(11;18)(q21;q21)$  é encontrada em 30 a 50% dos casos, mas está ausente no LCBZM esplênico e nodal. Nos linfomas MALT do tipo gástrico, esta anormalidade parece ser um marcador clonal para resistência à terapia de erradicação do *Helicobacter pylori* e crescimento independente de antígeno. Outras translocações observadas incluem a  $t(14;18)$  e, em um número menor de casos, a  $t(1;14)(p22;q32)$ . As anormalidades citogenéticas mais comuns descritas no LCBZM esplênico são as deleções de  $7q$  e de  $17p$  (envolvendo o gene *p53*) e as trissomias dos cromossomos 3 e 12. A perda de  $7q$  tem sido demonstrada em aproximadamente 40% dos casos. Por sua vez, a trissomia do cromossomo 3 tem sido reconhecida como um achado citogenético recorrente no LCBZM linfonodal. Contudo, como é a segunda anormalidade numérica mais observada em desordens linfoproliferativas, não pode ser considerada como específica para este subtipo de linfoma.<sup>7,12,13</sup>

O linfoma de células do manto (LCM) caracteriza-se por achados clínicos, morfológicos e genéticos distintos. Enquanto a morfologia e a imunofenotipagem têm sido amplamente usadas para definir esta entidade,

**Figura 25.1**  
Ideograma mostrando a translocação  $t(8;14)$ , característica do linfoma de Burkitt, que leva à justaposição dos genes *IGH* e *MYC* no cromossomo derivado 14.



existem crescentes estudos sugerindo que o método mais acurado para o seu diagnóstico seja mesmo a via genética. O achado citogenético principal deste subtipo de linfoma é a translocação t(11;14)(q13;q32). A CGH tem identificado também ganho recorrente de 3q e 8q e perda de 1p, 6q, 11q e 13q. O ganho de 3q tem sido observado em mais de 50% dos casos.<sup>7,8,12</sup>

Estudos mais antigos com a macroglobulinemia de Waldenström já identificavam várias anormalidades cromossômicas, sendo que nenhuma delas parecia ser recorrente.<sup>7</sup> Entretanto, mais recentemente, deleções de 6q e 13q têm sido observadas.<sup>14</sup> Casos de tricoleucemia têm-se mostrado difíceis de serem citogeneticamente analisados. Entretanto, naqueles avaliados com sucesso, as anormalidades numéricas e estruturais dos cromossomos 5, 7 e 14 têm se mostrado recorrentes.<sup>7</sup> A **Tabela 25.3** lista as principais anormalidades citogenéticas observadas em subtipos específicos de linfomas de células B.

Como observado ao longo da descrição dos diferentes subtipos de linfomas de células B,

as translocações são rearranjos cromossômicos frequentes. Elas, como também descrito anteriormente, em geral levam à justaposição de sequências de genes localizados em diferentes cromossomos (em especial, genes de imunoglobulinas e proto-oncogenes), com consequente alteração de suas funções. A **Tabela 25.4** mostra as principais translocações observadas em pacientes com linfomas de células B, com os respectivos genes envolvidos e fenótipos relacionados.

Linfomas de células T

Anormalidades citogenéticas observadas em linfomas de células T frequentemente envolvem, de forma similar ao verificado nos transtornos linfoproliferativos de células B, loci de genes de receptores de células T localizados em 14q11, 7q34 e 7p14.

No linfoma angioimunoblástico, as trisomias dos cromossomos 3, 5 e X têm sido recorrentes. Em relação à micose fungoide/síndrome de Sézary, os linfomas cutâneos de células T de baixo grau mais frequentemente apresentam um cariótipo normal, enquanto

TABELA 25.3  
Alterações citogenéticas observadas em linfomas de células B

Subtipo	Anormalidades citogenéticas
Linfoma/leucemia de Burkitt	t(8;14), t(8;22) e t(2;8)
Linfoma difuso de grandes células B	t(14;18), t(8;14), t(8;22), t(3;14) e t(3;22)
Linfoma folicular	t(14;18), t(2;18) e t(8;22)
Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico	Anormalidades em 11q e 13q, +12; t(14;19) são raras
Linfoma da zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa (MALT)	+3, +12 e +18, t(11;18), t(14;18), t(1;14) e t(3;14)
Linfoma da zona marginal esplênica	Deleções de 7q e 17p, +3 e +12
Linfoma da zona marginal linfonodal	+3
Linfoma de células do manto	t(11;14)
Linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldenström	Deleções de 6q e 13q
Tricoleucemia	Anormalidades numéricas e estruturais envolvendo os cromossomos 5, 7 e 14

+: indica a presença adicional do respectivo cromossomo; t: translocação; p: braço curto do cromossomo; q: braço longo do cromossomo.  
Fonte: Adaptada de Campbell,<sup>7</sup> Hartmann e colaboradores,<sup>8</sup> Raimondi<sup>13</sup> e Good e Gascoyne.<sup>14</sup>

que os de alto grau mostram deleções de 6q e 13q, além da trissomia 7q. Por sua vez, na leucemia prolinfocítica, a inversão do cromossomo 14 é um achado frequente, sendo que a trissomia 8q é uma anormalidade secundária também comum. A presença adicional dos cromossomos 3, 7 e 21 e a ausência de um cromossomo sexual são anormalidades numéricas comuns em linfoma de células T adultas. Alterações estruturais incluem a presença de translocações envolvendo 14q32 ou 14q11, e deleção de 6q.

Logo após a sua descrição morfológica inicial, o linfoma de grandes células anaplásicas foi caracterizado pela presença da translocação t(2;5) (45% dos casos). Este rearranjo leva à fusão gênica *NPM-ALK* no cromossomo derivado 5. Em relação ao linfoma do tipo entropático, um linfoma de células T extranodal caracterizado por células que adquirem o fenótipo de células T intestinais intraepiteliais, o ganho de 9q tem sido a anormalidade mais identificada (58% dos casos). A **Tabela 25.5** lista as principais anormalidades citogenéticas observadas em subtipos específicos de linfomas de células T.<sup>7,8,14</sup>

## Linfoma de células natural killer

Existem poucos grandes estudos avaliando as características citogenéticas de linfomas originários de células NK. Anormalidades têm sido descritas; contudo, nenhuma delas parece ser característica ou mesmo recorrente.<sup>7</sup>

## Linfoma de Hodgkin

As células de Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS) são consideradas as células neoplásicas do LH. Contudo, elas são uma minoria em número, com várias células reativas circundantes. Assim, a escassez de células neoplásicas HRS e a abundância daquelas não tumorais têm dificultado em muito a análise citogenética desta neoplasia.<sup>1,6,15</sup> Atualmente, várias anormalidades citogenéticas clonais têm sido identificadas (até cerca de 60% dos linfonodos analisados de pacientes com LH apresentam alterações), embora, no geral, nenhuma delas seja específica. Isto inclui: anormalidades estruturais envolvendo 4q, 6q, 12q e 13p.<sup>7</sup>

**TABELA 25.4**

Translocações observadas em linfomas de células B, com os respectivos genes envolvidos e fenótipos relacionados, demonstrando, em geral, o envolvimento de um gene de imunoglobulina (*IGH*, *IGL* e *IGK*) e de um proto-oncogene

Translocação	Genes envolvidos	Fenótipo
t(8;14)(q24;q32)	MYC/IGH	LB; LDGCB; LF; LCM
t(8;22)(q24;q11)	MYC/IGL	LB; LDGCB; LF
t(2;8)(p12;q24)	IGK/MYC	LB; LDGCB; LF
t(14;18)(q32;q21)	IGH/BCL2	LF; LDGCB
IGH/MALT1	LCBZM MALT	
t(3;14)(q27;q32)	BCL6/IGH	LDGCB
t(3;22)(q27;q11)	BCL6/IGL	LDGCB
t(2;18)(p12;q21)	IGK/BCL2	LF
t(18;22)(q21;q11)	BCL2/IGL	LF
t(11;18)(q21;q21)	AP12/MALT1	LCBZM MALT
t(11;14)(q13;q32)	CCND1/IGH	LCM

LB: linfoma de Burkitt; LDGCB: linfoma difuso de grandes células B; LF: linfoma folicular; LCM: linfoma de células do manto; LCBZM MALT: linfoma de células B de zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa.

Fonte: Adaptada de Campbell,<sup>7</sup> Hartmann e colaboradores,<sup>8</sup> Raimond<sup>13</sup> e Good e Gascoyne.<sup>14</sup>

## Significado clínico e prognóstico das anormalidades citogenéticas em linfomas

As classificações citogenética e molecular dos casos de linfoma provavelmente tornarão mais uniforme o diagnóstico e a habilidade em prever a resposta terapêutica e o prognóstico. Estudos recentes têm possibilitado a elucidação dos mecanismos patogênicos subjacentes, revelando a diferente biologia dos subtipos da doença. Além disso, a elucidação destas vias bioquímicas envolvidas na transformação irá, indubitavelmente, influenciar nas estratégias futuras de tratamento.<sup>16</sup>

A sobrevida de pacientes diagnosticados com LNH tem melhorado de forma marcante desde a década de 1990. Atualmente, estima-se que nos Estados Unidos a sobrevida em cinco anos seja de cerca de 70%. Esta melhora pode ser atribuída em parte à introdução de novos tratamentos, tal como a adição do rituximab à quimioterapia de pacientes com linfoma de grandes células B. Quanto ao LH, a aplicação dos protocolos de tratamento atuais, envolvendo vários agentes quimioterápicos e/

ou radioterapia, tem levado a um índice de cura de até 80 a 90%. Entretanto, uma parcela substancial dos pacientes com linfoma ainda não é curada. Assim, é fundamental identificar estes indivíduos de forma que novas abordagens terapêuticas possam ser desenvolvidas e utilizadas. Entretanto, a heterogeneidade clínica e biológica dos linfomas permanece como um grande desafio.<sup>6,9</sup>

Fatores de risco já bem estabelecidos e fundamentais para a avaliação do prognóstico de pacientes com linfoma incluem idade, estágio do tumor, número de locais extranodais acometidos pela doença e nível sérico de desidrogenase láctica.<sup>5</sup> Alguns marcadores citogenéticos também já têm sido associados ao prognóstico. No LF, a deleção de 17p, a presença de um cromossomo 12 adicional e anormalidades em 6q têm sido associadas a um prognóstico adverso. Por sua vez, a detecção da t(2;5)(p23;q35) em linfomas de grandes células anaplásicas é um importante marcador de melhor prognóstico.<sup>9,13</sup>

Apesar disso, até o momento, muitas das alterações citogenéticas detectadas em linfomas apresentam um significado mais diagnóstico do que propriamente prognóstico, como acontece com a t(14;18)(q32;q21) no LF e a t(11;14)(q13;q32) no LCM. Assim, o prognóstico de algumas das anormalidades recorrentes

**TABELA 25.5**  
Alterações citogenéticas observadas em linfomas de células T

Subtipo	Anormalidades citogenéticas
Leucemia prolinfocítica de células T	Inversão do cromossomo 14; trissomia 8q
Linfoma de células T/NK extranodal, do tipo nasal	Ganhos de 2q, 15q, 17q e 22q; perdas de 6q, 8p, 11q, 12q e 13q
Linfoma de células T do tipo enteropático	Ganho de 9q
Micose fungoide/síndrome de Sézary	Deleção de 6q e 13q; trissomia 13q
Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas	t(2;5)
Linfoma de células T angioimunoblástico	+3, +5, +21 e +X, ganhos de 5q e 3q
Linfoma de células T periférico, não especificado	Ganhos de 7q22-q31, 1q, 3p, 5p e 8q24-qter; perdas de 6q22-q24 e 10p13-pter
Linfoma de grandes células anaplásicas	t(2;5) e variantes

+: indica a presença adicional do respectivo cromossomo; t: translocação; p: braço curto do cromossomo; q: braço longo do cromossomo.  
Fonte: Campbell,<sup>7</sup> Hartmann e colaboradores<sup>8</sup> e Good e Gascoyne.<sup>14</sup>

tes ainda é incerto devido à diversidade dos resultados obtidos pelos estudos.<sup>9</sup>

Hoje em dia, novas técnicas, como a CGH, têm permitido a análise mais detalhada de alterações genômicas associadas a diferentes

subtipos de linfomas. Estudos futuros possivelmente demonstrarão o real papel destes achados citogenéticos, tanto para a compreensão da etiologia dos linfomas como para a determinação do seu prognóstico e o desenvolvimento de novas terapias.

## Referências

1. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma --diagnosis and treatment. *Lancet Oncol*. 2004 Jan;5(1):19-26.
2. Cheson BD. Staging and evaluation of the patient with lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008 Oct;22(5):825-37, vii-viii.
3. Paes RAP, Vassallo J, Alves AC, Menezes Y, Siqueira SAC, Aldred VL, et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematologia da Sociedade Brasileira de Patologia. *J Bras Patol Med Lab*. 2002 Jul-Set;38(3):237-9.
4. Raemaekers JMM, van der Maazen RWM. Hodgkin's lymphoma: new from an old disease. *Neth J Med*. 2008 Dec;66(11):457-66.
5. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiol Clin North Am*. 2008 Mar;46(2):175-98, vii.
6. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jan;9(1):15-27.
7. Campbell LJ. Cytogenetics of lymphomas. *Pathology*. 2005 Dec;37(6):493-507.
8. Hartmann EM, Ott G, Rosenwald A. Molecular biology and genetics of lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008 Oct;22(5):807-23, vii.
9. Johnston A, Salles G. Prognostic systems for lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008 Oct;22(5):839-61, viii.
10. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet*. 2002 Oct 30;115(3):130-41.
11. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer*. 1976 Jan 15;17(1):47-56.
12. Naeem RC. Cytogenetics of hematologic neoplasms. In: Gersen SL, Keagle MB, editors. *The principles of clinical cytogenetics*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2005. pp. 365-420.
13. Raimondi SC. Cytogenetics of lymphoid neoplasias. In: Mark HFL, editor. *Medical genetics*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2000. p. 349-412.
14. Good DJ, Gascoyne RD. Classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008 Oct;22(5):781-805, vii.
15. Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V. Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol*. 2004 Jan;5(1):11-8.
16. Johnson PW. New targets for lymphoma treatment. *Ann Oncol*. 2008 Jun;19 Suppl 4:iv56-9.

# Citogenética de tumores sólidos

## Introdução

A citogenética teve um grande impacto em diversos aspectos das ciências básica e médica, incluindo a genética clínica e de, forma muito importante, a hematologia e a patologia. Há aproximadamente cem anos foram descritas alterações do fuso mitótico e da divisão celular em neoplasias humanas, mas os primeiros estudos cromossômicos só aconteceram na década de 1960 com o desenvolvimento de metodologias que possibilitaram o cultivo e a interrupção das células mitóticas, permitindo, assim, as primeiras observações das alterações cariotípicas presentes nas células neoplásicas. No entanto, somente no início dos anos de 1970 é que começou a ocorrer um refinamento dos estudos cromossômicos, com o desenvolvimento das metodologias de bandejamento cromossômico (bandas Q, G e R), o que permitiu realmente que os cromossomos envolvidos nessas alterações fossem identificados e, mais do que isso, que as alterações estruturais tivessem seus pontos de quebra revelados com precisão. Todos esses eventos permitiram que fossem investigadas as correlações entre cariótipo e fenótipo de um grande número de doenças, incluindo as neoplasias.

Durante vários anos, a citogenética das neoplasias desenvolveu-se quase que exclusivamente relacionada às doenças hematológicas, muito porque o acesso ao material de estudo e o tipo de preparo para a análise citogenética são mais acessíveis nas neoplasias do sistema hematopoiético, as leucemias. O primeiro exemplo de alteração citogenética identificada em neoplasias foi o cromossomo *Philadelphia*

(Ph), descrito a partir de estudos de células de leucemia mieloide crônica com posterior refinamento de seu ponto de quebra e a identificação dos cromossomos envolvidos nessa alteração estrutural, quando foram desenvolvidas as técnicas de bandejamento cromossômico.

A citogenética dos tumores sólidos só começou a se desenvolver nos anos de 1980 em estudos com neoplasias de partes moles. Paralelamente à evolução da citogenética dos tumores sólidos, nessa época, começou a se desenvolver a genética molecular, o que permitiu que rapidamente, norteados pelas alterações cromossômicas recorrentes nessas neoplasias, fossem identificados *loci* cromossômicos e, a partir daí, genes envolvidos na gênese desses tumores. Entretanto, vale ressaltar que o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na iniciação e na progressão dos tumores algumas vezes não é possível a partir desses estudos, resultado da associação dessas alterações citogenéticas recorrentes com eventos cromossômicos secundários que refletem um fenômeno presente em um grande número de neoplasias, que é a instabilidade cromossômica, muitas vezes dificultando o entendimento do que é causa ou consequência no processo de carcinogênese.

As informações citogenéticas acumuladas nesses anos de estudo permitiram a identificação de um grande número de genes envolvidos nos processos de oncogênese em geral. Os rearranjos cromossômicos são associados com ativação de oncogenes, perda de função de genes supressores de tumor e indução de resistência a drogas. As alterações adquiridas e clonais especificamente associadas com subtipos patológicos de neoplasias malignas e



doenças pré-malignas têm um impacto prognóstico claro e são usadas orientando diversas vezes a escolha do tratamento, a estratificação de pacientes e a investigação de doença residual mínima.

## Instabilidade cromossômica e câncer

A instabilidade cromossômica evidenciada por perdas e ganhos cromossômicos ocorre na grande maioria dos tumores sólidos de adulto, enquanto a instabilidade como resultado de alterações nos mecanismos de reparo é rara. Dessa forma, as alterações cromossômicas numéricas, denominadas aneuploidias, são reconhecidas como as alterações genéticas mais prevalentes nesses tumores.

As células em divisão dependem da duplicação do centrôssomo, região da célula que constitui o centro da atividade da divisão celular. Quando as células são ineficientes em coordenar a duplicação do centrôssomo com a replicação do DNA, é inevitável a ocorrência de alteração da ploidia, e a formação de fuso monopolar ou multipolar levará à segregação anormal dos cromossomos. Além disso, erros no ciclo de duplicação do centrôssomo são uma importante causa de aneuploidia e podem contribuir para o processo tumoral. Uma evidência disso é a descrição de centrôssomos supranumerários em quase todos os tumores humanos, apontando a aneuploidia como um evento de mutação cromossômica que contribui para a transformação e a progressão tumoral. Em carcinoma gástrico e carcinoma papilífero de tireoide, a ocorrência de aneuploidia é um indicador de metástase; em adição, algumas aneuploidias são frequentes em tipos específicos de tumor, como a trissomia 17 em carcinoma papilífero renal e a trissomia 8 em tumor mesoblástico renal.

Um argumento favorável ao envolvimento da instabilidade cromossômica na transformação maligna é que a aneuploidia é um evento mutacional cromossômico dinâmico associado à elevada taxa de instabilidade. A literatura propõe que a taxa de perdas e ganhos cromossômicos é proporcional ao grau de aneuploidia preexistente nas células transformadas. Assim, a aneuploidia desestabilizaria

o cariótipo, alterando o fenótipo e levando à progressão do tumor.

## Citogenética clássica: arte dentro da ciência

O sucesso na obtenção de cromossomos a partir de amostras tumorais depende de diversos pontos, uma vez que a manutenção da viabilidade das células é o aspecto essencial para o estabelecimento da cultura celular. Assim, alguns aspectos críticos desse processo incluem coleta do material em meio de cultura, transporte rápido para o laboratório onde o material será processado e processamento e manutenção adequados.

As formas de cultivo, o meio de cultura utilizado, o tempo de crescimento, o momento e o tempo de exposição ao inibidor mitótico e a forma de preparação citológica das células para análise variam de um tumor para outro. Em geral, as células tumorais permanecem em cultura por mais de uma semana até que o componente tumoral aumente seu potencial de crescimento, o que depende diretamente do tamanho da amostra coletada. Como os tumores são heterogêneos quanto à informação genética das células que os constituem, quanto maior o fragmento tumoral coletado, maior será a representatividade das células tumorais em cultura, minimizando assim a presença de células necróticas e dos componentes não neoplásicos. Tumores de alto grau podem ser submetidos à preparação direta para obtenção de células metafásicas. Esses tumores muitas vezes não crescem em cultura, mas também só produzem metáfases por processamento e preparação citológica direta, sem cultivo se o tempo entre a coleta e o processamento não exceder uma hora.

Podemos observar que a citogenética clássica envolve procedimentos laboriosos, além da necessidade de análise por um técnico com experiência em estudos de neoplasias. No entanto, o estudo cariotípico permite uma visão geral de organização do genoma, além de revelar novos mecanismos associados a alterações clonais e marcadoras de determinados tipos de tumores. Um exemplo interessante de identificação desses mecanismos é a observação de pequenos marcadores, denominada



amplificação gênica, um mecanismo exclusivo de células tumorais em humanos (**Figura 26.1**). Essas sequências são assim chamadas pois, ao microscópio, podemos observar diversos marcadores, denominados amplicons, que são sequências cromossômicas que incluem um determinado gene. Dessa forma, nessas células o número de cópias desse gene aumenta, em muitos casos, mais de 100 vezes, podendo assim resultar em uma maior quantidade de seu produto final. Como na maioria das vezes esses amplicons incluem oncogenes, a contribuição para o fenótipo maligno e, portanto, para a progressão tumoral é evidente.

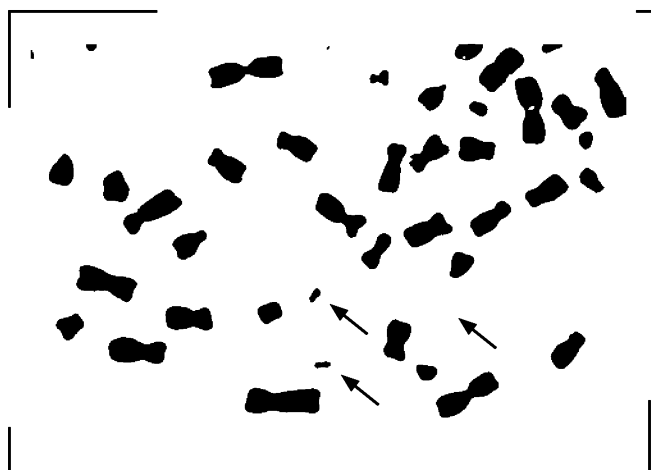
Em câncer de mama, o oncogene *ERBB2/HER2/NEU*, receptor de fator de crescimento de epiderme, pode estar amplificado e, como resultado, a célula disponibiliza maior quantidade de receptor de fator de crescimento de epiderme. Aproximadamente 20 a 30% dos cânceres de mama superexpressam *ERBB2/HER2/NEU*, resultado de amplificação, o que confere maior agressividade desses tumores e aumento do risco de recorrência em comparação com os tumores sem amplificação.

Outro exemplo muito interessante é a amplificação não de um oncogene típico, como descrito anteriormente, mas de um gene híbrido resultante de uma translocação gênica marcadora do rabidomiossarcoma alveolar. Nesse tumor, a  $t(1;13)(p36;q14)$  origina um rearranjo gênico entre o gene *PAX7* localizado em 1p36 e o gene *FKHR* localizado em 13q14 – esse novo gene resultado da fusão tem fun-

ção oncogênica. O mecanismo físico através do qual regiões específicas de translocação sofrem amplificação não é conhecido, mas o resultado biológico é claro. Nas células desse tumor, frequentemente se observa amplificação do gene híbrido *PAX7/FKH*. Esse mecanismo sugere que as células podem não ser tolerantes à amplificação do cromossomo translocado inteiro, mas toleram muito bem a amplificação do rearranjo produto dessa translocação, por conferir uma vantagem oncogênica para as células onde esse evento ocorre.

Em meduloblastoma/PNET, tumor embrionário mais frequente da infância, em 50% dos casos é observado um isocromossomo do braço longo do cromossomo 17 (117q). A investigação desse marcador cromossômico nas células tumorais é um indicativo de pior prognóstico. Essa observação tem possibilitado uma vasta exploração e um aumento do entendimento dos genes localizados no cromossomo 17 e seu envolvimento com os diversos processos tumorais, não só o do meduloblastoma/PNET. Um exemplo são os estudos relacionados com o gene *TP53*, principalmente no que diz respeito a sua interação com o restante do genoma do cromossomo 17.

As alterações cromossômicas estruturais observadas em tumores originam uma reestruturação aberrante do genoma. As translocações equilibradas, onde não há perda ou ganho de material cromossômico, podem alterar a quantidade de produto final de um determi-



**Figura 26.1**

Metáfase tumoral evidenciando amplificação cromossômica extra-cromossômica (três desses minúsculos duplos estão indicados pelas setas).

nado gene, principalmente quando o ponto de quebra molecular envolve a região promotora do gene. Essas translocações também podem dar origem a genes híbridos, bem como alterar a função de um gene por disrupção direta de sua sequência codificante. Até o momento, já foram identificadas cerca de 358 fusões gênicas em neoplasias humanas, e a maioria delas é resultado de alterações cromossômicas equilibradas. Muitos genes ainda serão reconhecidos, pois algumas alterações apresentam grande heterogeneidade dos pontos de quebra, além da multiplicidade de parceiros cromossômicos.

A literatura tem demonstrado que existem *loci* gênicos específicos relacionados com a heterogeneidade de pontos de quebra nos rearranjos estruturais; no entanto, ainda não se conhece o mecanismo molecular que atua controlando essas escolhas. O gene EWS, localizado em 22q12, é o gene mais envolvido em translocações associadas aos sarcomas (**Tabela 26.1**). Um exemplo são os tumores da família Ewing, que atualmente têm recebido essa designação por apresentarem em aproximadamente 85% dos tumores uma translocação específica, t(11;22)(q24;q12), envolvendo os genes FLI1 em 11q24 e EWS em 22q12.

Reconhecemos que existem muitas diferenças entre o genoma das células tumorais e suas contrapartidas normais, e muitas dessas diferenças são evidenciadas através do cariótipo das células tumorais. São tantas as alterações já identificadas que seria impossível descrever cada uma delas em um único livro; assim, selecionamos para apresentarmos aqui somente algumas (**Tabela 26.2**) e sugerimos a consulta do *site Cancer Genome Anatomy Project*,<sup>1</sup> que objetiva catalogar alterações cro-

mossômicas, bem como sua relação com características tumorais, com base em casos individualmente descritos ou associações, para a investigação ou o conhecimento de um maior número desses rearranjos. Todas as informações apresentadas no *site* são selecionadas da literatura por três pesquisadores históricos da citogenética do câncer: Felix Mitelman, Bertil Johansson e Fredrik Mertens.

**Citogenética molecular: estratégias técnicas fundamentais para o avanço da citogenética tumoral**

A citogenética clássica requer uma alta taxa de divisão celular e boa morfologia cromossômica que permitam a distinção entre eventos críticos e irrelevantes, o que em tumores sólidos representa um desafio. Várias metodologias alternativas ao bandeamento cromossômico clássico surgiram durante as últimas décadas e têm permitido a identificação de alterações específicas, principalmente relacionadas a rearranjos complexos e ao refinamento da citogenética clássica. Essa nova área que combina a especificidade, resultado da utilização de sequências específicas denominadas sondas, com a possibilidade de identificação dessas sequências, através da formação de híbridos tanto em cromossomos metafásicos quanto em núcleos interfásicos, é denominada citogenética molecular.

A técnica central da citogenética molecular é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que possibilita a hibridização, a detecção e a localização de sequências de ácidos nucleicos marcados com fluorescência em

**TABELA 26.1**  
Alterações cromossômicas envolvendo o gene EWS

Tipo de tumor	Alteração cromossômica	Genes envolvidos
Sarcoma de células claras	t(12;22)(q13;q12)	ATF1/EWS
Família Ewing de tumores	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12)	FLI1/EWS ERG/EWS ETV1/EWS
Condrossarcoma mixoide extra esquelético	t(9;22)(q22;q12)	CHN ou TEC/EWS
Tumor desmoplásico de células redondas	t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1

cromossomos, células e cortes de tecidos. Essa estratégia amplia em muito a abrangência da citogenética na investigação dos tumores sólidos e reduz o tempo de preparo e análise do material, algumas vezes, para poucas horas. As sondas mais utilizadas nas investigações são de DNA de estruturas cromossômicas específicas, como sondas centroméricas e teloméricas; sondas de sequência específica, como sonda de um gene de cópia única, ou ainda sondas de pintura cromossômica que cobrem completamente um determinado cromossomo. Após a hibridização, o número de cópias e a localização dessas sequências são reconhecidos através de um microscópio de fluorescência. A FISH tem permitido a identificação específica do ponto de quebra de translocações presentes em tumores sólidos pela utilização de sondas de sequências proximais mapeadas ao redor de um ponto de quebra cromossômico, marcado com um fluorocromo, e sondas de sequências distais mapeadas ao redor do outro ponto de quebra, marcado com um fluorocromo diferente. O núcleo positivo para a translocação apresentará um sinal duplo resultado da fusão, representando o cromossomo derivado da translocação e dois sinais de cores diferentes evidenciando os dois alelos normais.

A FISH completa a informação da citogenética clássica. Em casos de amplificação gênica, a utilização de sonda gene-específica permite identificar o gene, o número de cópias por células e a forma de amplificação,

extracromossômica, como pequenos marcadores chamados de minúsculos duplos, ou intracromossômica, onde os minúsculos duplos se agrupam e se reintegram em uma região cromossômica, formando as chamadas regiões homogeneamente coradas. Em neuroblastoma e câncer de mama, a amplificação do gene *MYCN* e *ERBB2/HER2/NEU*, respectivamente, classifica os tumores de pior prognóstico. Em câncer de mama, a identificação da amplificação de *ERBB2/HER2/NEU* seleciona as pacientes que podem ser beneficiadas com uma droga específica que tem como alvo o produto desse gene.

A partir dessa metodologia, várias outras técnicas foram desenvolvidas com base na cinética de hibridização e na possibilidade de acesso e análise através de *softwares* específicos. Essas técnicas são principalmente FISH-multiplex (M-FISH), cariótipo espectral (SKY) e hibridização genômica comparativa (CGH). M-FISH e SKY são técnicas similares, com base em esquema de combinação de cinco fluorocromos para marcar sondas de pintura cromossômica para todos os 24 cromossomos humanos. Essas metodologias permitem a identificação de rearranjos cromossômicos complexos e/ou crípticos impossíveis de serem identificados com as técnicas clássicas de bandeamento. Nos estudos de tumores sólidos, essas estratégias aumentaram muito o direcionamento de investigações moleculares específicas e da utilização da FISH na validação dos achados.

**TABELA 26.2**  
Alterações cromossômicas presentes em tumores sólidos

Tipo de tumor	Alteração cromossômica	Genes envolvidos
Rabdomiossarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3/FKHR PAX7/FKHR
Ependimoma	-22	
Adenoma folicular de tireoide	+5, +12, t(2;3)(q12-13;p14-15)	
Lipoma atípico	+12q15-q24	HGMIC
Lipoma mixoide	t(12;16)(q13;p11)	CHOP, TLS/FUS
Carcinoma papilar de tireoide	inv(10)(q11.2q21) t(10;17)(q11.2;q23)	RET
Meduloblastoma	i(17p)	
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SSX1/SSX2, SYT
Tumor de Wilms	del(11)(p13-15)	WT1

A CGH possibilita a visualização de ganhos e perdas cromossômicas a partir de metáfases normais, com a grande vantagem de não necessitar de cultura de células tumorais. Nessa metodologia, amplamente utilizada em investigação de tumores sólidos, o DNA do genoma tumoral é marcado com um fluorocromo, e uma amostra de DNA genômico de células normais é marcada com outro fluorocromo. Quantidades iguais de cada um dos DNAs, tumoral e referência, são coprecipitadas com DNA rico em repetições (Cot-1 DNA), para bloqueio das sequências repetitivas, e é essa sonda que irá hibridizar com metáfases normais imobilizadas em uma lâmina. Regiões representadas tanto no DNA tumoral quanto no DNA referência apresentarão fluorescência balanceada dos dois fluorocromos, enquanto regiões deletadas no DNA tumoral só apresentarão a cor da fluorescência do DNA normal, e regiões de ganho no DNA tumoral apresentarão uma maior representação da fluorescência do DNA tumoral. A CGH é

uma metodologia que possibilita uma visão geral do genoma, permitindo a identificação de oncogenes e de genes supressores de tumor envolvidos na iniciação e na progressão dos tumores sólidos, orientando uma análise mais detalhada de regiões cromossômicas específicas. Esse detalhamento muitas vezes é feito por uma variante da CGH cromossômica, a CGH *array*, que tria regiões cromossômicas fornecendo detalhes moleculares, aproximando ainda mais a citogenética da genética molecular.

O progresso observado na citogenética dos tumores sólidos foi acelerado a partir do desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular. A possibilidade de investigar núcleos interfásicos pela FISH possibilitou uma aproximação entre a ciência básica e a prática clínica, orientando o diagnóstico e a detecção precoce, a determinação prognóstica, a orientação terapêutica e o monitoramento clínico de um número cada vez mais significativo de neoplasias.

---

## Referência

1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors. Mitelman database of chromosome aberrations in cancer (2010). In: Cancer Genome Anatomy Project [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010. [capturado em 2010 Jul 12]. Disponível em: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

---

## Leitura recomendada

Cooper CS. Translocations in solid tumors. Georgetown: Landes Bioscience; 2002.

# Síndromes de microdeleção cromossômica

## Introdução

Síndromes de microdeleção são um grupo de patologias clinicamente reconhecíveis, caracterizadas por uma deleção de um segmento cromossômico. A região cromossômica com a deleção apresenta, em geral, menos de 5 Mb, podendo conter múltiplos genes que contribuem independentemente para o fenótipo.<sup>1</sup> As alterações genéticas frequentemente não são detectadas pelo cariótipo com resolução de rotina (500 bandas). Para tanto, é necessária a aplicação de técnicas de citogenética molecular como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Recentemente, o uso de hibridização genômica comparativa (CGH) tem possibilitado a identificação de novas alterações citogenéticas.<sup>2</sup>

## Mecanismos de microdeleção cromossômica

As síndromes de microdeleção ocorrem, geralmente, como resultado de recombinação homóloga não alélica devido a características próprias do genoma. São frequentes, no genoma humano, repetições de pequeno número de cópias (LCRs, de *low-copy repeats*). Estas regiões repetitivas permitem um pareamento anormal na meiose, levando à deleção ou à duplicação de determinado segmento cromossômico. Este mecanismo é em geral esporádico, isto é, não herdado dos pais, levando a baixo risco de recorrência.<sup>3</sup>

## Síndromes de microdeleção

As características clínicas são resultados da haploinsuficiência de alelos específicos contidos no intervalo crítico deletado. Várias síndromes, com padrões dismórficos reconhecidos clinicamente, já foram descritas, estando listadas na **Tabela 27.1**.<sup>4</sup>

### Síndrome de Prader-Willi

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma patologia comum com prevalência de 1 a cada 15.000 a 30.000 recém-nascidos. Ela apresenta um padrão clínico reconhecido com características dismórficas associadas à deficiência mental e alteração de comportamento.<sup>5</sup>

Os indivíduos afetados apresentam hipotonia na infância com dificuldade de alimentação, que evolui para hiperfagia e obesidade mórbida em torno de 1 a 4 anos de idade. Eles apresentam, ainda, baixa estatura, hipogonadismo e alteração do comportamento, podendo também desenvolver distúrbio do sono, incluindo apneia central e obstrutiva. A mortalidade está diretamente relacionada a alterações secundárias da obesidade como problemas cardiovasculares e respiratórios.

A SPW ocorre em 70% dos casos devido à deleção na região 15q11.2-q13 no cromossomo de origem paterna. Dissomia uniparental materna (isto é, a presença de dois cromossomos 15 de origem materna sem contribuição paterna) é responsável por 20 a 30% dos casos de

SPW. Somente 2 a 5% dos casos ocorrem por mutações no centro de impressão gênica (*imprinting*).

O teste diagnóstico mais comumente usado para o diagnóstico de SPW é o de metilação no *locus SNRPN* cuja região promotora é não metilada no alelo de origem paterna e metilada no alelo de origem materna. Indivíduos normais apresentam os dois tipos de alelos, um metilado e outro não metilado. Indivíduos com SPW apresentam somente alelos metilados de origem materna.<sup>5</sup>

### Síndrome de Angelman

A síndrome de Angelman (SA) é caracterizada por deficiência mental grave associada à ausência de fala, risos inapropriados, microcefalia, macrostomia, hipoplasia maxilar e crises convulsivas. A incidência é estimada em 1 a cada 10.000 a 20.000 indivíduos.

A SA ocorre por alterações na região 15q11-q13. Em 60 a 75% dos casos, ocorre por deleção nesta região no cromossomo de origem

materna. Em 2 a 5 % dos casos, a SA ocorre por dissomia uniparental paterna, em 2 a 5% por mutações no centro de *imprinting*, e em 10% por mutações no gene *UBE3A*.<sup>6</sup>

### Síndrome velo-cardio facial

A síndrome velo-cardio facial (SVCF) apresenta uma incidência de 1 a cada 2.000 a 7.000 recém-nascidos. Ela ocorre por deleção do cromossomo 22 na banda q11.2. Aproximadamente 90% dos casos apresentam deleção de 3 Mb com pontos de quebra idênticos tanto na região proximal quanto na região terminal. Menos de 10% dos casos apresentam uma deleção menor que 1,5 Mb cujo ponto de quebra é o mesmo da deleção mais comum na região proximal. Raros casos apresentam deleções atípicas. Não foram descritas, até o momento, diferenças entre as manifestações clínicas nos diferentes tamanhos de deleção.

A SVCF apresenta um amplo espectro clínico, incluindo deficiência mental, alterações imunológicas, face típica e anomalias cardíacas.

**TABELA 27.1**  
Principais síndromes de microdeleção

Síndrome	Características fenotípicas	Localização citogenética
Prader-Willi	Hipotonia, hiperfagia, obesidade, baixa estatura, mãos e pés pequenos, retardo mental	15q11-q13
Angelman	Hipotonia, microcefalia, marcha atáxica, risos imotivados, crises convulsivas, retardo mental	15q11-q13
Miller-Dieker	Lisencefalia, face dismórfica	17p13.3
Velo-cardio facial	Face característica, fissura palatal, hipoplasia de timo, hipocalcemia, defeitos cardíacos	22q11
Langer-Giedion	Cabelos esparsos, nariz bulboso, epífises em forma de cone, exostose múltipla, retardo mental	8q24.1
WAGR	Aniridia, tumor de Wilms, displasia geniturinária, retardo mental	11p13
Smith-Magenis	Face característica, alteração de comportamento, comportamento autodestrutivo, neuropatia, retardo mental	17p11.2
Williams	Face característica, hipercalcemia, defeitos cardíacos, personalidade agregadora, envelhecimento precoce da pele, retardo mental	7q11.23
Deleção 1p36	Hipotonia, atraso do desenvolvimento, dificuldade de ganho pômbero-estatural, dismorfias faciais, malformações cardíacas menores	1p36

cas. Cerca de 70% dos pacientes apresentam anomalias cardíacas congênitas, sendo uma alta percentagem devido a anomalias conotruncais incluindo arco aórtico interrupto tipo B e tetralogia de Fallot. As anomalias cardíacas na SVCF ocorrem devido à hemizigose do gene *TBX1*. Anomalias de palato, como palato fendido submucoso, também são comuns levando à hipernasalidade. Outras características frequentes são anomalias oculares, anomalias de membros, meningocele, além de anomalias anais, cerebrais e imunológicas. Pacientes com SVCF apresentam 25 vezes maior chance de desenvolver problemas psiquiátricos.<sup>7</sup>

## Síndrome de Smith-Magenis

A síndrome de Smith-Magenis (SMS) apresenta uma incidência estimada de 1 a cada 25.000 nascidos vivos, sendo causada pela deleção na região 17p11.2 levando a haploinsuficiência do gene do ácido retinoico induzido 1 (*RAI1*). Tal deleção causa um padrão consistente de características físicas, atraso de desenvolvimento e alterações de comportamento.<sup>8</sup> Os achados clínicos incluem face distinta, apresentando braquicefalia, fronte proeminente, sinofre, pregas epicânticas, base nasal alargada, orelhas displásicas, alterações dentárias e prognatismo. Além disso, os indivíduos frequentemente apresentam braquidactilia, neuropatia periférica, voz grave e rouca, surdez e sensibilidade à dor diminuída. Indivíduos com SMS também podem apresentar graus variáveis de deficiência mental e geralmente apresentam atraso na fala. As características mais reconhecíveis e específicas da SMS são os distúrbios do sono e os problemas de comportamento, tais como balanço da cabeça, auto e heteroagressão, abraços em si mesmo, onicotilomania (arrancar unhas tanto das mãos como dos pés) e poliembolocoilomania (inserir objetos nos orifícios corporais).

O manejo clínico desses pacientes inclui terapias para os distúrbios do sono, programas de estimulação precoce, educação especial, treinamento vocacional e abordagem multidisciplinar para as manifestações sistêmicas e comportamentais.<sup>9</sup>

Aproximadamente 90% dos casos de SMS são causados por uma deleção detectável por

FISH (1,5 a 9 Mb), apresentando, em 70% dos casos, uma deleção comum de 3,7 Mb na região 17p11.2. Os 10% restantes dos casos de SMS são causados por mutações no gene *RAI1*.<sup>10</sup>

## Síndrome de Williams-Beuren

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é um distúrbio do desenvolvimento que afeta 1 em 20.000 a 50.000 nascidos vivos.<sup>11</sup>

Ela é suspeitada em indivíduos com os seguintes achados clínicos: doença cardiovascular como estenose aórtica supravalvar (75% dos casos), arteriopatia e estenose pulmonar periférica na infância; face distinta (estreitamento bitemporal, íris estreitada, nariz pequeno, hipoplasia malar, filtro longo, lábios grossos, boca larga, má oclusão dentária, lobos das orelhas proeminentes) e anormalidades do tecido conjuntivo (voz rouca, hérnias, divertículo intestinal, limitação ou frouxidão das articulações).<sup>12</sup>

Quanto ao aspecto psicossocial, os pacientes apresentam deficiência mental em graus variáveis, personalidade agregadora, simpatia exagerada, déficit de atenção e ansiedade.<sup>13</sup>

Setenta por cento dos pacientes com SWB apresentam dificuldade de ganho pênodo-estatural. Na infância, pode aparecer refluxo gastroesofágico, constipação e otites de repetição. A presença de hipercalcemia, hipotireoidismo, puberdade adiantada, porém não precoce, e outras anormalidades endocrinológicas é marcante.<sup>14</sup>

O manejo de pacientes com SWB deve compreender programas de intervenção precoce, educação especial e treinamento vocacional. Acompanhamento fonoterápico, psicoterápico e psiquiátrico, avaliação cardiológica e endocrinológica frequente, bem como prevenção de complicações secundárias.

A SWB ocorre devido à deleção na região 7q11.23 compreendendo 1,55 Mb em 95% dos indivíduos afetados e 1,84 Mb nos outros 5%. A deleção pode ser tanto de origem materna quanto paterna, sem diferenças clínicas entre elas.<sup>15</sup>

Vários genes presentes na região crítica WBSCR (7q11.23) foram reconhecidos como associados à SWB. A sonda comercial de FISH mais comum cobre cerca de 180 kb da WBSCR



deletada e inclui os genes *ELN*, *LIMK1* e o *locus* D7S613. Além de FISH, pode ser usada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real, que dosa o número de cópias de três genes da WBSCR (*ELN*, *LIMK1* e *GTF2I*). Se for encontrada apenas uma cópia de um dos genes, isso indica deleção na região crítica.<sup>16</sup>

Na maioria das vezes, os pais de indivíduos com SWB não são afetados. Estudos recentes demonstraram que em aproximadamente 25 a 30% dos casos a deleção se originou de recombinação desigual devido à inversão do cromossomo 7 envolvendo a região 7q11.23 no cromossomo paterno ou materno. Cerca de 6% da população geral também possui essa inversão, indicando, portanto, um polimorfismo.<sup>15,17</sup> Alguns casos familiares já foram descritos em pais clinicamente normais.<sup>18</sup>

## Síndrome de Miller-Dieker

A síndrome de Miller-Dieker é causada pela deleção da região 17p13.3. Seu fenótipo consiste em lisencefalia, deficiência mental e face característica, incluindo fronte proeminente, estreitamento bitemporal, microcefalia, nariz pequeno com narinas antevertidas, lábio superior protuberante e micrognatia.<sup>19</sup>

Há relatos de casos autossômicos recessivos, porém a maioria apresenta a deleção comum. A região deletada 17p13.3 abrange o gene responsável pela lisencefalia (*LSI*).<sup>20</sup> A deleção da região 17p13.3 pode ocorrer por diversos mecanismos, tais como recombinação de uma translocação balanceada parental, inversão do cromossomo 17, cromossomo 17 em anel ou uma deleção *de novo*. Aproximadamente 50% das deleções são detectadas por rotina citogenética, mas FISH com sonda específica para a região comum é o método de escolha para detectar ou confirmar tal microdeleção.<sup>21</sup>

## Síndrome de Langer-Giedion

A síndrome de Langer-Giedion (síndrome trico-rino-falangeal tipo II – TRPS II) é uma síndrome de genes contíguos envolvendo a deleção de pelo menos dois genes (*TRPS I* e *EXT I*) que são responsáveis por duas doenças de caráter autossômico dominante (síndrome

trico-rino-falangeal tipo I, ou TRPS I, e exostose múltipla), apresentando características clínicas de ambas. O fenótipo consiste em atraso do desenvolvimento, cabelos esparsos, nariz bulboso, epífises das falanges em forma de cone e exostoses múltiplas.<sup>22</sup> A microdeleção de *TRPS I*, *EXT I* e outros genes causadores de atraso do desenvolvimento, localizados na região 8q24.1, é responsável pelas características dos pacientes.<sup>23</sup>

Em muitos casos, essa deleção pode ser detectada por análises de rotina ou de alta resolução, porém a técnica de escolha é a FISH.

## Associação WAGR

WAGR é um acrônimo para tumor de Wilms, aniridia, displasia geniturinária e retardo mental ou de crescimento. A causa de tal associação é uma deleção no braço curto do cromossomo 11 na região 11p13. Pacientes com essa deleção apresentam ausência de íris (aniridia) e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.<sup>24</sup> Alguns indivíduos com cariótipo XY podem apresentar reversão sexual, com genitália externa fenotipicamente feminina.<sup>25</sup> É comum o desenvolvimento de tumor de Wilms, um tumor renal muito frequente na infância. Como a associação dessas características é frequente, todas as crianças que apresentem tal deleção devem ser monitoradas quanto ao aparecimento de tumor de Wilms.<sup>26</sup>

A estratégia mais utilizada para evidenciar a deleção dessa região é a FISH.<sup>27</sup>

## Deleção 1p36

Uma síndrome de microdeleção envolvendo a região 1p36.3 tem sido reportada com aumento de frequência ao longo dos últimos anos, com prevalência estimada de 1 em 5.000 a 10.000 nascidos vivos.<sup>28</sup> Características fenotípicas dessa síndrome incluem hipotonia, atraso do desenvolvimento, retardo mental e de crescimento, microcefalia, obesidade, dismorfias craniofaciais (fontanelas amplas, ponte nasal baixa, hipoplasia de face média, fendas faciais) e malformações cardíacas.<sup>29</sup> Muitas vezes, esses pacientes são encaminhados por suspeita de SPW, devido à hipotonia e posterior obesidade.



Muitos pacientes são diagnosticados por técnicas citogenéticas convencionais, devido a uma banda escura e dupla, vista na região 1p36. O diagnóstico pode ser feito utilizando *kits* com sondas subteloméricas, porém FISH continua sendo o método de escolha.

## Aconselhamento genético em síndromes de microdeleção

A maioria das microdeleções não é herdada, tratando-se de um evento esporádico. Nestes casos, não há necessidade de análise dos pais. O risco de recorrência (ter outro filho afetado) é desprezível na maioria dos casos, porém não nulo em decorrência de não podermos descartar mosaicismos germinativos.

Em casos de suspeita de alterações cromossômicas balanceadas, como inversões ou translocação cromossômica, que podem ter favorecido a microdeleção na prole, deve-se solicitar cariótipo para descartar estes rearranjos. Se um dos pais possuir um rearranjo cromossômico estrutural balanceado, o risco de ter novos filhos afetados é aumentado de acordo com a anomalia apresentada.

Indivíduos portadores da síndrome têm um risco teórico de 50% de transmitir a alteração cromossômica a seus descendentes. Um portador da deleção aparentemente não afetado também tem 50% de chance de transmitir essa alteração para seus filhos.

Como há uma região bem estabelecida relacionada a essas síndromes, há possibilidade de diagnóstico pré-natal e pré-implantacional.

## Referências

- Schmickel RD. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *J Pediatr*. 1986 Aug;109(2):231-41.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. 2007. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007 Nov 15;145C(4):335-45.
- Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*. 2005 Dec;1(6):e49.
- Schinzel A. Microdeletion syndromes, balanced translocations, and gene mapping. *J Med Genet*. 1988 Jul;25(7):454-62.
- Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009 Jan;17(1):3-13.
- Van Buggenhout G, Fryns JP. Angelman syndrome (AS, MIM 105830). *Eur J Hum Genet*. 2009 Nov;17(11):1367-73.
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(1):3-10.
- Juyal RC, Figueroa LE, Hauge X, Elsea SH, Lupski JR, Greenberg F, et al. Molecular analyses of 17p11.2 deletions in 62 Smith-Magenis syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1996 May;58(5):998-1007.
- Elsea SH, Girirajan S. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2008 Apr;16(4):412-21.
- Schmickel RD. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *J Pediatr*. 1986 Aug;109(2):231-241.
- Vlangos CN, Wilson M, Blancato J, Smith AC, Elsea SH. Diagnostic FISH probes for del(17)(p11.2p11.2) associated with Smith-Magenis syndrome should contain the RAI1 gene. *Am J Med Genet A*. 2005 Jan 30;132A(3):278-82.
- Tassabehji M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet*. 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R229-37.
- Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr*. 1988 Aug;113(2):318-26.
- Doyle TF, Bellugi U, Korenberg JR, Graham J. "Everybody in the world is my friend" hyper-sociality in young children with Williams syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004 Jan 30;124A(3):263-73.
- Partsch CJ, Japing I, Siebert R, Gosch A, Wessel A, Sippell WG, Pankau R. Central precocious puberty in girls with Williams syndrome. *J Pediatr*. 2002 Sep;141(3):441-4.
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet*. 2003 Jul;73(1):131-51.
- Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ, et al. GTF2L hemizygosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A*. 2003 Nov 15;123A(1):45-59.

17. Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):321-5.
18. Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet.* 1993 Sep 15;47(4):468-70.
19. Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet.* 1991 Mar;48(3):584-94.
20. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns W B, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature.* 1993 Aug 19;364(6439):717-21.
21. Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, et al. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet.* 2003 Apr;72(4):918-30.
22. Langer LO Jr, Krassikoff N, Laxova R, Scheer-Williams M, Lutter LD, Gorlin RJ, et al. The tricho-rhino-phalangeal syndrome with exostoses (or Langer-Giedion syndrome): four additional patients without mental retardation and review of the literature. *Am J Med Genet.* 1984 Sep;19(1):81-112.
23. Lüdecke HJ, Wagner MJ, Nardmann J, La Pillo B, Parrish JE, Willems PJ, et al. Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995 Jan;4(1):31-6.
24. Fischbach BV, Trout KL, Lewis J, Luis CA, Sika M. WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics.* 2005 Oct;116(4):984-8.
25. Le Caignec C, Delnatte C, Vermeesch JR, Boceno M, Joubert M, Lavanant F, et al. Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient. *Am J Med Genet A.* 2007 Nov 15;143A(22):2692-5.
26. Muto R, Yamamori S, Ohashi H, Osawa M. Prediction by FISH analysis of the occurrence of Wilms tumor in aniridia patients. *Am J Med Genet.* 2002 Apr 1;108(4):285-9.
27. Crolla JA, Cawdery JE, Oley CA, Young ID, Gray J, Fantes J, et al. FISH approach to defining the extent and possible clinical significance of deletions at the WAGR locus. *J Med Genet.* 1997 Mar;34(3):207-12.
28. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, et al. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep;61(3):642-50.
29. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, et al. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics.* 2008 Feb;121(2):404-10.

# Citogenética molecular

## Desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular

As técnicas de citogenética clássica, baseadas em bandeamentos cromossômicos, permitem o diagnóstico de alterações cromossômicas estruturais com a identificação de deleções, inversões, inserções, translocações e outros rearranjos cromossômicos. No entanto, muitas aberrações estruturais, como pequenas deleções e duplicações menores do que 3 a 5 milhões de pares de base (Mb), cromossomos marcadores e rearranjos cromossômicos complexos, não são possíveis de serem identificadas ou bem caracterizadas. Além disso, os procedimentos citogenéticos clássicos necessitam de cromossomos em metáfase, estando limitados a certas células e tecidos.

No final da década de 1980, a citogenética foi muito beneficiada com a incorporação da técnica de FISH. Essa técnica se fundamenta nos estudos pioneiros de Pardue e Gall<sup>1</sup> para a identificação dos genes de RNAr em cortes histológicos de tecidos de *Xenopus*, os quais utilizavam marcação radioativa para a detecção de híbridos de RNA-DNA marcados radioativamente. As técnicas utilizando híbridos DNA-DNA usando preparações cromossômicas logo se seguiram, mas a abordagem inicial permanece a mesma até os nossos dias.

Para evitar o uso de radioisótopos, Pinkel e colaboradores<sup>2</sup> desenvolveram um método utilizando fluorocromos para a detecção das reações de hibridização *in situ*, técnica que ficou conhecida como FISH, sigla em inglês

para *fluorescent in situ hybridization*. Nessa técnica, utilizam-se sondas específicas para certas regiões cromossômicas marcadas com fluorocromos.

A hibridização pode ser realizada em cromossomos metafásicos, núcleos interfásicos, fibras cromossômicas estendidas ou, mais recentemente, em microarranjos (*arrays*) de DNA. Amostras de diferentes origens podem ser analisadas: amostras pós-natal (de sangue, pele, medula óssea, linfonodos e tumores sólidos, entre outras), amostras pré-natal (de vilosidades coriônicas, líquido amniótico ou sangue fetal) e, ainda, de embriões pré-implantação.

Desde então, a técnica de FISH tem sido muito utilizada na citogenética, pois representa um método rápido, confiável e preciso para o diagnóstico cromossômico.

## Princípio da técnica

FISH é um procedimento citoquímico que permite verificar e detectar sequências de ácidos nucleicos específicas em células metafásicas e interfásicas.<sup>2,3</sup> A técnica é baseada na formação de um híbrido entre sequências de DNA ou regiões específicas presentes nas células ou em cromossomos de preparações citológicas e sondas de DNA marcadas. O híbrido formado pode ser observado diretamente ao microscópio, ou após uma marcação imunocitoquímica com fluorocromos de anticorpos específicos.<sup>2</sup>

Para a técnica de FISH, são utilizadas basicamente sondas de DNA contendo dois elementos, o inserto (i.e., o DNA complementar

à sequência-alvo no cromossomo) e o vetor (i.e., uma sequência de DNA não relacionada na qual o inserto será clonado, permitindo a replicação do DNA). As sondas são pedaços de DNA genômico capazes de se ligar a suas cadeias complementares, produzindo moléculas híbridas. As preparações citogenéticas são realizadas por procedimentos de rotina. O DNA cromossômico e o da sonda são desnaturados e então colocados em temperatura adequada para haver hibridização. Se houver complementaridade das bases da sonda e do DNA-alvo, haverá hibridização, a qual é identificada através dos fluorocromos utilizados para a marcação da sonda. A hibridização da sonda ao DNA-alvo é observada em microscópio de fluorescência. Dado o número de sondas e fluorocromos que existem, é possível a marcação múltipla, com a hibridização simultânea e a detecção de duas ou mais sondas na mesma preparação citológica.

A sensibilidade da técnica de FISH, ou seja, a visualização por microscopia de fluorescência do sinal que indica se houve ou não hibridização, é basicamente determinada pelo tamanho da área-alvo delimitada pela sonda. Sequências até menores do que 1 Kb podem ser detectadas.<sup>4</sup> Existem vários tipos de sondas de DNA utilizadas em FISH, sendo que as mais utilizadas em citogenética humana são as de sequências repetitivas, as de bibliotecas de DNA ou “pintura cromossômica” e as de cópia única ou *locus*-específicas (**Figura 28.1**).

As sondas de DNA  $\alpha$ -satélite, presente nos centrômeros de todos os cromossomos, con-

têm sequências de DNA repetidas em tandem. Essas sequências demonstram 20 a 40% de divergência umas com relação às outras, de forma que existem sondas específicas para quase todos os centrômeros dos cromossomos humanos. As sondas centroméricas apresentam sinais intensos de fluorescência e podem ser utilizadas em diferentes aplicações, como detecção de aneuploidias, determinação do sexo em núcleos interfásicos, detecção da origem de cromossomos marcadores ou em anel e enumeração cromossômica em amostras pré-implantação e pré-natais, em tumores sólidos e em doenças hematológicas. Algumas sondas são utilizadas em conjunto, como as sondas para a detecção das trissomias 13, 18 e 21 e das alterações numéricas dos cromossomos sexuais X e Y, utilizadas principalmente em exames pré-natais e pré-implantação, como em amniócitos não cultivados e em blastômeros de embriões (**Figura 28.2**).

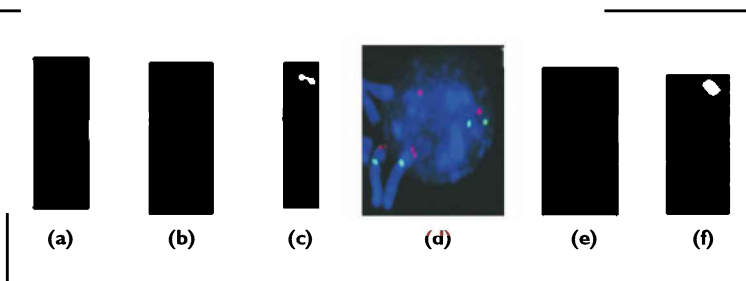
Sondas *locus*-específicas, ou de cópia única, identificam pequenas regiões do genoma e possibilitam a detecção de alterações cromossômicas, permitindo análise de pontos de quebra específicos nos cromossomos.<sup>5,8</sup> Estas sondas são essenciais para a determinação de várias síndromes de microdeleção. Para o diagnóstico citogenético das síndromes de microdeleção mais frequentes existem sondas comerciais de DNA disponíveis. Assim, as sondas de DNA de sequência única são úteis para a identificação de regiões genômicas específicas, como a deleção 22q11.2 na síndrome de DiGeorge e a deleção 7q11.23 na síndrome

**Figura 28.1**

**Exemplos de tipos de sondas de DNA utilizadas em FISH.**

(a) Sondas de biblioteca de DNA (“pintura cromossômica”). (b) Sondas de biblioteca de DNA para um braço cromossômico (“pintura cromossômica parcial”).

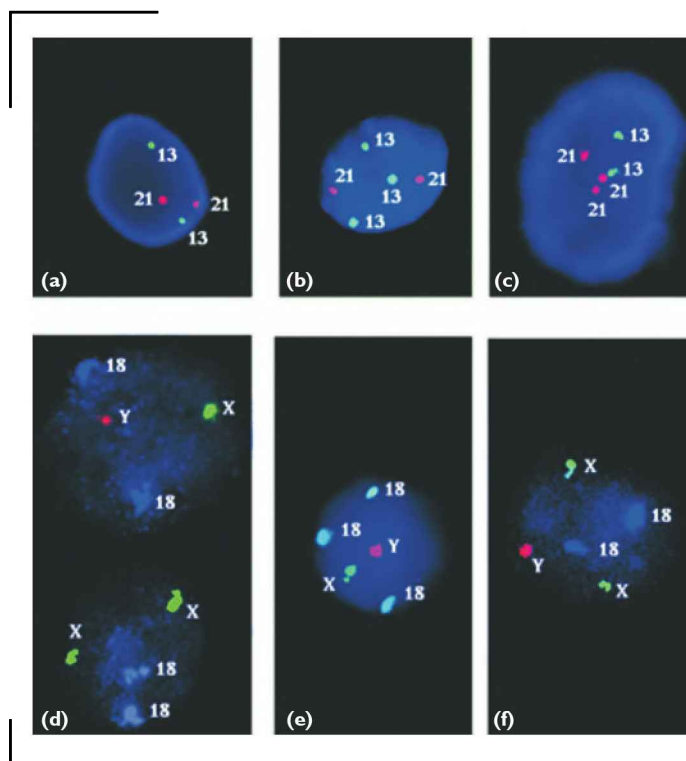
(c) Sondas *locus*-específicas. Região crítica da síndrome de Cri-du-Chat (5p15.2, verde) e sonda controle (5q31, vermelho). (d) Sonda *locus*-específica em interfase e metáfase. Região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16.3, vermelho) e sonda controle (4p11.1-q11.1, verde). (e) Sonda centromérica do cromossomo 4. (f) Sondas subteloméricas do cromossomo 3, braço curto (verde) e braço longo (vermelho).



de Williams-Beuren (**Figura 28.3**). Para a detecção de microdeleções, são utilizadas simultaneamente duas sondas marcadas com fluorocromos de diferentes cores: uma sonda específica para a região comumente deletada na síndrome e uma sonda controle, específica para outra região do mesmo cromossomo. Sondas de sequência única subteloméricas são utilizadas para detectar rearranjos crípticos envolvendo as regiões terminais dos cromossomos. As sondas de sequência única também podem ser utilizadas para a detecção das translocações mais frequentes e alterações cromossômicas presentes em doenças hematológicas e em diferentes tipos de câncer, como a amplificação do gene *MYCN* no neuroblastoma. Para a determinação exata dos pontos de quebra em aberrações cromossômicas e estudos mais detalhados dos cromossomos, não existem sondas comerciais suficientes, uma vez que estão restritas a poucas regiões genômicas e limitadas às alterações cromossômicas mais frequentes. No entanto, podem

ser construídas sondas para uma infinidade de regiões cromossômicas.<sup>8</sup> Em geral, essas sondas são preparadas a partir de segmentos de DNA clonados em cromossomos artificiais de bactéria (BACs), cromossomos artificiais de levedura (YACs), cromossomos artificiais P-1 (PACs) ou em cosmídeos, podendo cobrir toda a extensão do genoma.

A maioria das sondas de “pintura cromossômica” disponíveis é originada de clones de bibliotecas de DNA,<sup>9,10</sup> ou de amplificações de sequências de híbridos humano-roedores por reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>11</sup> e frequentemente é utilizada na caracterização de translocações cromossômicas. Entretanto, o potencial da maioria das sondas de sequências repetitivas e de bibliotecas de DNA é limitado. Para muitos estudos citogenéticos, como a detecção de microdeleções e microduplicações de regiões cromossômicas, as sondas de cópia única são mais informativas. As sondas de pintura cromossômica são especialmente úteis na definição de rearranjos *de novo* e de



**Figura 28.2**

**FISH interfásica em células amnióticas não cultivadas.**

(a) Célula normal com dois sinais para os cromossomos 13 (verde) e 21 (vermelho). (b) Três sinais verdes indicando trissomia do cromossomo 13. (c) Três sinais vermelhos indicando trissomia do cromossomo 21. (d) No topo, célula normal masculina com dois cromossomos 18 (azul), um cromossomo X (verde) e um cromossomo Y (vermelho). Abaixo, célula feminina normal com dois cromossomos 18 (azul) e dois cromossomos X (verde). (e) Trissomia do cromossomo 18 (3 sinais azuis) em uma célula masculina (um sinal verde e um sinal vermelho). (f) XXY: dois sinais azuis (cromossomo 18) e dois sinais verdes (XX) mais um sinal vermelho (cromossomo Y). Foto cedida por M. Riegel, com autorização de Schinzel. Fonte: Adaptada de Schinzel.<sup>7</sup>

cromossomos marcadores e na citogenética do câncer (**Figura 28.4**).

## Nomenclatura cromossômica em FISH

O Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana é responsável pela padronização da nomenclatura cromossômica.<sup>12</sup>

A nomenclatura para a técnica de FISH deve indicar a sonda utilizada, o cromossomo e a banda correspondentes a ela, bem como o número de cópias de marcação observadas com a sonda. Se for realizada também a citogenética convencional, o resultado deve ser colocado em primeiro lugar, seguido por um ponto (.), e a nomenclatura resultante da FISH deve ser indicada pela abreviatura *ish*, um espaço e o resultado da hibridização.

Assim, o cariótipo 46,XX.ish 22q11.2 (D22S75 x 2) indica que a análise por métodos de citogenética clássica evidenciou um cariótipo feminino normal e, por FISH, utilizando a sonda D22S75 (localizada em 22q11.2 na região responsável pela síndrome de DiGeorge), evidenciou padrões normais de hibridização nos dois cromossomos 22. Por outro lado, o cariótipo 46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2) (D22S75-) indica uma deleção da região correspondente à sonda D22S75.

As sondas utilizadas podem ser de sequência centromérica (p. ex., D15Z4, sonda do DNA satélite do centrômero do cromossomo 15), de sequência única (p. ex., SRY, gene SRY do cromossomo Y), de cromossomo inteiro (p. ex., wcp17, sonda de pintura cromossômica do 17), entre outras.

Quando a análise dos cromossomos é feita por FISH apenas em núcleos interfásicos, utiliza-se o símbolo *nuc ish*, seguido pelo número de sinais de fluorescência observados com as respectivas sondas de DNA. Por exemplo, *nuc ish* (DSCR1 x 2) ou *nuc ish* 21q22.1(DSCR1 x 2) indica que há duas cópias do locus DSCR1 (específico para o cromossomo 21); *nuc ish* (DSCR1 x 3) indica que foram observadas três cópias do locus DSCR1, havendo, portanto, a presença de três cromossomos 21 – indicativo de trissomia deste cromossomo.

Com o desenvolvimento crescente de novos métodos em citogenética molecular, a nomenclatura cromossômica tem sido discutida constantemente, e próximas edições revisadas do ISCN estão previstas.

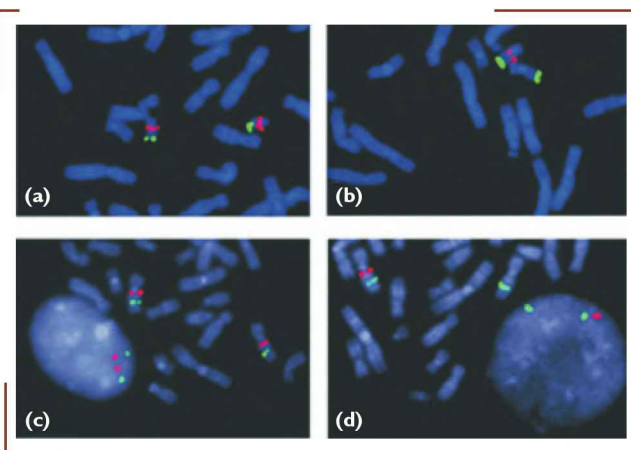
## Variantes da técnica de FISH

A otimização do método de hibridização *in situ* resultou no desenvolvimento de diferentes técnicas com base no princípio da FISH.

**Figura 28.3**

### FISH com sondas locus-específicas.

(a) e (b) Sonda da região DiGeorge/VCFS 22q11.2 (vermelho) e de 22q13 (sonda controle, verde): (a) Metáfase parcial com dois cromossomos 22 normais. Sem deleção. (b) Ausência de um sinal vermelho em um dos cromossomos 22 indicando deleção na região 22q11.2. (c) e (d) Sonda do gene ELN (elastina) de 7q11.23 (vermelho) e de 7q31 (sonda controle, verde). (c) Metáfase parcial e núcleo interfásico com dois cromossomos 7 normais. (d) Ausência de sinal vermelho em um dos cromossomos 7, indicando uma deleção na região 7q11.23, responsável pela síndrome de Williams-Beuren.





## Cariotipagem espectral (SKY) ou multiplex FISH (M-FISH)

A cariotipagem espectral (sky, de *spectral karyotyping*) e a técnica de M-FISH (*multiplex FISH*) utilizam uma combinação de fluorocromos que emitem comprimentos de onda distintos, de forma que cada um dos 24 cromossomos diferentes emita seu próprio espectro (**Figura 28.5**). Cada uma dessas técnicas emprega um método de detecção próprio para a discriminação das diferentes combinações de fluorescência após a hibridização *in situ*. Essas técnicas são especialmente úteis para se detectar translocações e outras aberrações complexas, como as observadas em células tumorais.

## Bandeamento multicores (mBAND)

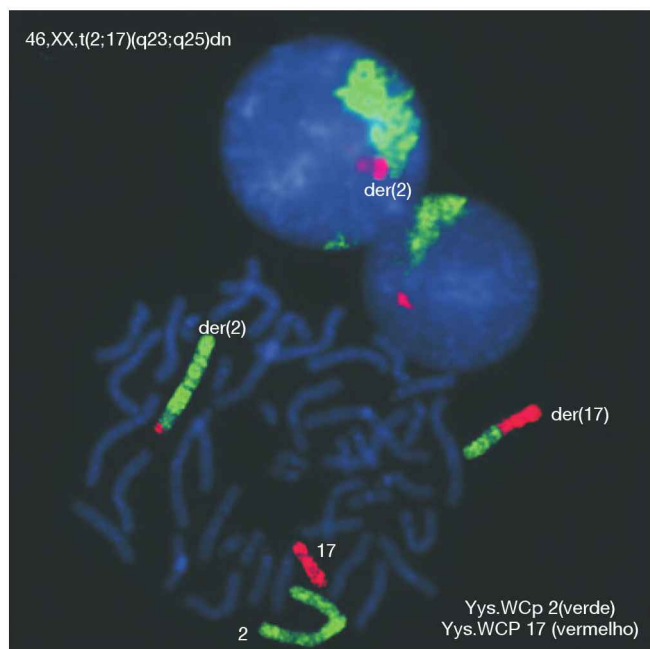
Uma variante da técnica de FISH é o bandejamento cromossômico multicores (mBAND), no qual o cromossomo inteiro é hibridizado com uma combinação de sondas de diferentes regiões cromossômicas marcadas com fluorocromos distintos, resultando em um padrão

de bandas coloridas ao longo do cromossomo, de acordo com a intensidade de fluorescência resultante da hibridização (**Figura 28.6**). A análise por mBAND é útil para definir rearranjos intracromossômicos e aberrações complexas.

## Microdissecção e pintura cromossômica reversa (*reverse painting*)

A microdissecção de cromossomos ou regiões cromossômicas foi descrita pela primeira vez por Scalenghe e colaboradores<sup>13</sup> em cromossomos de *Drosophila melanogaster*. Entretanto, a aplicação do método de microdissecção e *reverse painting* em cromossomos de mamíferos e, posteriormente, em cromossomos humanos começou a ser divulgada no final da década de 1980.<sup>10,14,15</sup>

A microdissecção consiste em coletar fisicamente, com o auxílio de um micromanipulador, o cromossomo inteiro, ou um segmento específico dele. Após o fragmento de interesse ser isolado, procede-se a etapa de amplificação e marcação da sequência de DNA que será utilizada como sonda de DNA.

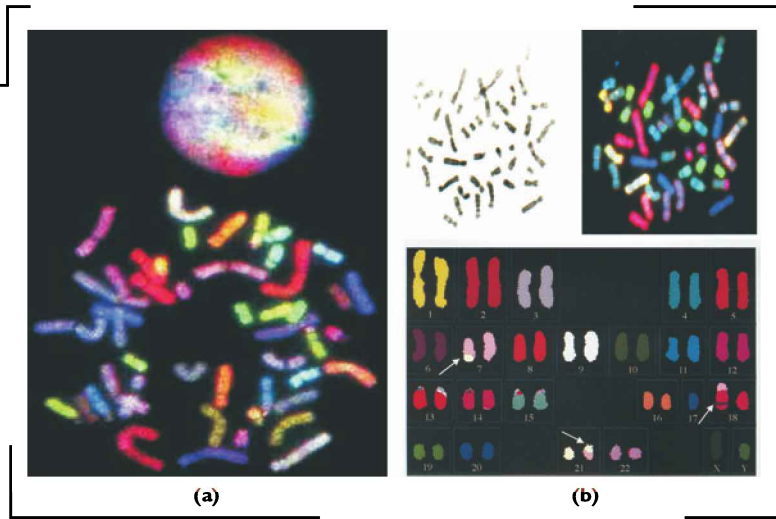


**Figura 28.4**

FISH com sondas de biblioteca de DNA (Vysis Inc., Dowers Grove IL (U.S.A.) específicas para os cromossomos 2 (verde) e 17 (vermelho). A figura mostra uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 2 (verde) e 17 (vermelho). Utilizando o método de FISH por "pintura cromossômica", observa-se um pequeno segmento do cromossomo 17 (vermelho) translocado para o cromossomo 2 (der2) e um segmento do cromossomo 2 (verde) translocado para o cromossomo 17 (der17).

**Figura 28.5**

(a) Cariótipo de 24 cores por FISH multicores (m-FISH). (b) Cariótipo de 24 cores por Sky.



Nesta etapa, a técnica de PCR, utilizando um *primer* de oligonucleotídeo degenerado (DOP-PCR), é empregada. A técnica baseia-se na utilização de um *primer* semidegenerado (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') que permite, portanto, a amplificação de qualquer segmento de DNA de qualquer fonte, e a partir de poucos fragmentos.

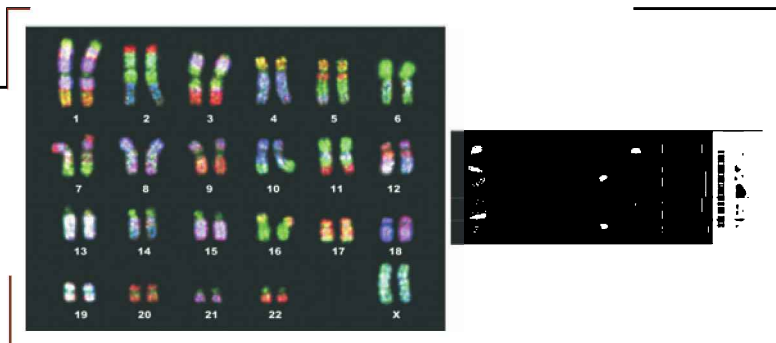
A microdissecção cromossômica pode ser utilizada em citogenética clínica principalmente para a caracterização de aberrações cromossômicas envolvendo cromossomos marcadores e derivados. O princípio do método requer a microdissecção do cromossomo ou da região cromossômica de interesse (p. ex., cromossomo marcador ou uma banda cromossômica extra). A partir do material obtido, prepara-se uma sonda de DNA utilizando-se o método de DOP-PCR. Essa sonda de DNA, gerada a par-

tir da dissecção do cromossomo alterado ou de parte dele, é utilizada para hibridização em preparações citológicas contendo metáfases normais (FISH reversa). A sequência de DNA da sonda preparada a partir do material dissecado é desconhecida. Assim, a visualização da região hibridizada em uma metáfase normal (*reverse painting*) permite a determinação do segmento ou da região cromossômica equivalente ao material dissecado, revelando a origem do cromossomo marcador ou do segmento cromossômico de interesse (**Figura 28.7**). A hibridização com a mesma sonda de DNA deverá ser realizada em metáfases do paciente, para posterior controle.

A combinação de microdissecção, DOP-PCR e FISH tem sido chamada de micro-FISH, sendo também utilizada em estudos comparativos e evolutivos dos cromossomos entre espécies.

**Figura 28.6**

Metáfase sob mBAND (à esquerda) e marcação do cromossomo 1 (à direita) com uma combinação de fluorocromos resultando em diferentes bandas ao longo de seu comprimento.





## PRINS (*primed in situ labelling*)

PRINS é um método de coloração fluorescente de regiões específicas do cromossomo, com base no anelamento específico *in situ* de uma sequência de DNA de interesse, complementar ao DNA-alvo. É uma espécie de PCR realizada na própria lâmina, e consiste em se fazer uma mistura contendo *primers*, dNTPs, enzima Taq polimerase, tampão, glicerol, molécula repórter (biotina ou digoxigenina), fluoresceína e água destilada. Esta mistura é colocada sobre a lâmina, que é, então, deixada em uma máquina de PCR por temperaturas e tempos que permitirão que ocorra a desnaturação dos cromossomos, o anelamento do *primer* e seu alongamento.

## Hibridização genômica comparativa (CGH) e *array*-CGH

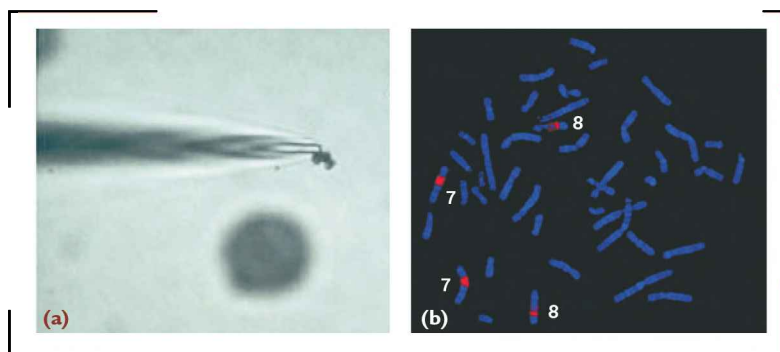
A técnica de CGH e a variante *array*-CGH permitem a identificação de regiões com ganho ou perda de material cromossômico a partir do estudo do DNA. Essas técnicas são baseadas na co-hibridização de um DNA teste e um DNA referência, marcados diferen-

cialmente (fluorocromos verde e vermelho, respectivamente) em lâminas contendo cromossomos metafásicos normais ou em microarranjos (*arrays*) de DNA. Essa técnica será discutida em um capítulo separado.

## Aplicações da técnica de FISH

O desenvolvimento da citogenética molecular aumentou a capacidade do diagnóstico pré-natal e pós-natal em relação à detecção pela citogenética clássica, permitindo uma melhor caracterização de síndromes causadas por deleções e outros rearranjos cromossômicos em humanos. A aplicação de técnicas citogenéticas que utilizam ferramentas moleculares tem permitido:

- uma melhor caracterização de aberrações cromossômicas previamente descritas, particularmente cromossomos marcadores extras e duplicações *de novo*, as quais, com os métodos de bandeamento citogenético convencionais, não poderiam ser caracterizadas,



**Figura 28.7**

**Microdissecção cromossômica.** (a) Cromossomo marcador adicional dissecado de um cariótipo 48,XY,+mar,+mar. (b) Pintura cromossômica reversa (FISH reversa) em uma metáfase normal. As sondas de biblioteca, obtidas do DNA a partir dos cromossomos marcadores dissecados, hibridizam nos centrômeros dos cromossomos 7 e 8, indicando a origem dos cromossomos marcadores.

- a detecção de microdeleções e microduplicações no nível de gene e
- a contribuição para o mapeamento de genes em combinação com várias aberrações citogenéticas como, por exemplo, a identificação de microdeleções e translocações balanceadas ou inversões com ruptura de um ou mais genes.

Assim, com o uso de técnicas de citogenética molecular foi possível a identificação de alterações cromossômicas que não podiam ser caracterizadas pela citogenética clássica. Além disso, a determinação dos pontos de quebra por meio de FISH permite estabelecer o tamanho dos segmentos cromossômicos envolvidos na aberração e fornece dados importantes para a compreensão da variabilidade fenotípica encontrada nos pacientes portadores de rearranjos cromossômicos não equilibrados, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na produção da aberração.

A técnica de FISH pode ser usada na triagem de aneuploidias, fornecendo um método rápido e sensível de análise de células interfásicas, como no caso de células de amostras de vilosidades coriônicas, células amnióticas e esfregaço de mucosa bucal. A preparação para a análise dos cromossomos a partir de células cultivadas do líquido amniótico ou de cultura de vilosidades coriônicas necessita em média de sete a quinze dias. Embora a análise de vilosidades coriônicas possa ser feita após uma cultura de curta duração (um dia), a qualidade das preparações para análise cromossômica frequentemente produz uma resolução de bandeamento muito baixa e, portanto, inadequada para um diagnóstico citogenético seguro. O método rápido de FISH possibilita uma triagem dos núcleos em interfase diretamente nas células fetais. A triagem é feita para as aneuploidias comuns dos cromossomos autossomos 13, 21, 18 e as alterações numéricas dos cromossomos X e Y. A avaliação citogenética pré-natal por FISH é um teste rápido para a detecção de aneuploidias que pode gerar um resultado em um ou dois dias. As sondas mais utilizadas para a detecção de aneuploidia, e também de poliploidia, são as sondas centrômero-específicas.

Tanto sondas centrômero-específicas quanto as de bibliotecas de DNA (pintura cromossômica) podem ser utilizadas para a identificação

da origem de cromossomos marcadores, uma vez que através das técnicas clássicas de citogenética isso nem sempre é possível.

Estudos citogenéticos com FISH foram cruciais para a investigação de microdeleções, como a deleção 15q nas síndromes de Prader-Willi e Angelman, localizadas, respectivamente, nas cópias paternas e maternas do cromossomo 15.<sup>16</sup> Aplicando a técnica de FISH, revelou-se que pequenas sequências repetitivas menores que 10 Kb, denominadas duplicações segmentais, ou *low-copy repeats*, estariam envolvidas em rearranjos relacionados a doenças genômicas, como no caso da síndrome de DiGeorge/velo-cardio facial, associada a uma deleção de aproximadamente 3 Mb em 22q11.2,<sup>17</sup> e da doença de Charcot-Marie Tooth tipo 1A, decorrente de uma duplicação de cerca de 1,4 Mb em 17p12.<sup>18</sup> Essas pequenas deleções e duplicações podem ser demonstradas por FISH utilizando sondas de sequência única. A determinação da presença de microdeleções cromossômicas específicas para cada síndrome por meio de FISH fornece dados importantes para a confirmação ou não do diagnóstico clínico respectivo. A otimização do método de FISH tem permitido uma melhor compreensão da composição genômica em humanos, além de viabilizar uma correlação entre o cariótipo encontrado e o fenótipo dos indivíduos estudados.

Homens XX apresentam desenvolvimento testicular na ausência de um cromossomo Y detectável. Através da FISH usando como sonda sequências específicas do Y, incluindo a região determinante do sexo no cromossomo Y (gene *SRY*), é possível detectar sequências de Yp na maioria dos homens com cariótipo XX, os quais apresentam então uma translocação entre Xp e Yp.

A sexagem de células humanas envolve a detecção dos cromossomos sexuais em núcleo interfásico ou em metáfase. Em amostras pós-natais (em interfase), isso é importante para o monitoramento do progresso de um transplante de medula óssea, quando o doador e o receptor são de sexos opostos. Em amostras pré-natais, a sexagem pode ser útil para a identificação de fetos masculinos em famílias em risco para a transmissão de doenças recessivas ligadas ao X.

A técnica de FISH fornece um importante recurso para a citogenética do câncer. Podem

ser utilizadas sondas centroméricas para a investigação de aneuploidias e de *double minutes* em certos cânceres. Sondas de sequência única são utilizadas na investigação de rearranjos frequentes em células tumorais, como a fusão dos genes BCR-ABL na leucemia mieloide crônica. O uso de sondas X e Y- específicas para determinar a proporção de células receptoras e doadoras em pacientes que receberam

transplante de medula óssea de indivíduo do sexo oposto é importante para o monitoramento do sucesso do transplante e da reincidência da doença, assim como para monitorar a doença residual mínima de alguns tipos de câncer. Desta forma, a tecnologia da FISH tem demonstrado ser uma potente ferramenta para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer.

## Referências

- Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969 Oct;64(2):600-4.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 May;83(9):2934-8.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*. 1988 Nov;80(3):224-34.
- Wiegant J, Galjart NJ, Raap AK, d'Azzo A. The gene encoding human protective protein (PPGB) is on chromosome 20. *Genomics*. 1991 Jun;10(2):345-9.
- Jones C, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, et al. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet*. 1994 Dec;3(12):2123-30.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet*. 1995 Feb;9(2):132-40.
- Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed. Berlin; New York: de Gruyter; 2001.
- USGC Genome Bioinformatics [Internet]. Santa Cruz, CA: Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California; c2010. Disponível em: <http://www.genome.ucsc.edu/>
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9138-42.
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, et al. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992 Apr;4(3):257-63.
- Lengauer C, Riethman H, Cremer T. Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers. *Hum Genet*. 1990 Nov;86(1):1-6.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. ISCN 2009 an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 2009.
- Scalenghe F, Turco E, Edström JE, Pirrotta V, Melli M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*. 1981;82(2):205-16.
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*. 1989 Mar 23;338(6213):348-50.
- Senger G, Lüdecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet*. 1990 May;84(6):507-11.
- Lalande M. Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet*. 1996;30:173-95.
- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, et al. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet*. 2004 Feb 15;13(4):417-28.
- Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, et al. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet*. 2003 May;72(5):1101-16.

Mariluce Riegel

# Hibridização genômica comparativa em microarranjos ou *array*-CGH

## Introdução

A análise cromossômica de rotina, ou cariótipo, tem sido utilizada como investigação-padrão em indivíduos com suspeita de cromossomopatias, com retardo mental e múltiplas malformações congênitas e dismorfismo de causa desconhecida. A análise e o estudo dos cromossomos através do cariótipo possibilitaram a descoberta de vários genes associados a uma série de distúrbios genéticos. Entretanto, o cariótipo apresenta limitações na capacidade de identificação de alterações cromossômicas (4 a 10 Mb, dependendo da resolução do bandejamento cromossômico), não sendo possível a identificação de alterações cromossômicas menores. Nas últimas décadas, técnicas de citogenética molecular (veja o Capítulo 28), incluindo a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (*array*-CGH ou aCGH), têm sido utilizadas, possibilitando uma melhor detecção de anomalias cromossômicas e um melhor diagnóstico citogenético. A análise de DNA por aCGH também tem sido denominada, por alguns autores, “cariótipo molecular”.<sup>1</sup> *Array*-CGH é uma técnica que permite investigar perdas e ganhos de sequências de DNA no genoma inteiro. O uso desta tecnologia tem possibilitado o diagnóstico molecular de alterações cromossômicas submicroscópicas previamente não detectadas, principalmente em indivíduos com deficiência mental e/ou múltiplas malformações congênitas de causa desconhecida. Pela técnica de aCGH tem sido possível o delineamento de novas síndromes e

o mapeamento de genes envolvidos na etiologia de várias condições clínicas.

A possibilidade de realização de um cariótipo molecular pela aCGH permite a detecção de variação do número de cópias de DNA ao longo do genoma inteiro em uma única análise. Esta possibilidade aumentou consideravelmente a detecção de rearranjos cromossômicos desbalanceados. Estudos citogenéticos mostraram que é possível uma detecção de anomalias cromossômicas em 10% dos indivíduos com retardo mental, com ou sem dismorfias, enquanto o cariótipo molecular com aCGH aumenta consideravelmente a detecção em mais 10%.<sup>2</sup>

## O método de *array*-CGH

No método de aCGH, a análise cromossômica por metáfases é substituída pela análise de DNA genômico, representando uma vantagem significativa em termos de acurácia e resolução em relação ao cariótipo convencional. O DNA genômico de um indivíduo afetado por determinada condição é extraído de sangue periférico, fibroblastos ou outro tecido disponível. Esse DNA teste é marcado pela incorporação de um precursor de nucleotídeo contendo um fluorocromo apropriado (p. ex., Cy5 dCTPs), um grupo químico que fluoresce quando exposto à luz de um comprimento de onda específico. O DNA teste, junto com quantidades iguais de DNA controle (normal) marcado com outro fluorocromo (p. ex., Cy3 dCTPs), é co-hibridizado a uma matriz de DNA contendo segmentos de DNA (clones)

pré-selecionados correspondentes às diferentes localizações cromossômicas. Cerca de milhares ou milhões de clones de DNA (produzidos a partir de clones de BAC ou PAC, cDNA, oligonucleotídeos, produtos de PCR, polipeptídeos ou SNPs) mapeados e representativos do genoma são imobilizados em uma placa ou lâmina (plataforma) e são usados como a fase sólida para a hibridização. A distância entre cada alvo imobilizado pode variar de alguns milímetros a poucos micrômetros, dependendo do tipo de *arrays*. A molécula imobilizada em uma lâmina ou placa é indicada como uma sonda, enquanto o alvo é a molécula em solução exposta ao *array*.

Após a co-hibridização, a fluorescência emitida por cada clone é capturada por varredura de fluorescência, utilizando-se um *scanner*. Uma imagem fluorescente é gerada, e a intensidade de fluorescência emitida por Cy3 (DNA teste) e Cy5 (DNA controle) é comparada. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um *software* específico que converte os dados da intensidade de hibridização para um perfil linear. A **Figura 29.1** ilustra a estratégia envolvida nesta técnica. A aCGH permite a identificação da variação do número de cópias genômicas ou do número de cópias genômicas alteradas. Ganhos ou duplicações no DNA teste são identificados pelo padrão quantitativo de fluorescência aumentada, enquanto perdas ou deleções resultam em um padrão quantitativo de fluorescência reduzida. Duplicações no DNA são diferenciadas por apresentarem razões de fluorescência maiores, em decorrência do maior número de cópias de DNA encontradas em uma região específica, em comparação com o DNA de referência (normal). Da mesma forma, deleções são diferenciadas por apresentarem razões de fluorescência menores, em decorrência da ausência de sequências de DNA genômico encontradas em uma região específica, em comparação com o DNA de referência (normal). Por exemplo, se a razão da quantidade de fluorescência emitida por Cy3 e Cy5 em um *spot* é igual, a região cromossômica do DNA teste (DNA do indivíduo afetado) que está sendo analisada é interpretada como sendo balanceada ou normal. Neste caso, não há perda (deleção) ou ganho (duplicação) de sequências de DNA na região cromossômica

alvo. Uma razão de intensidade de fluorescência maior de Cy5, quando comparada com Cy3, sugere um ganho de sequências de DNA ou duplicação de sequências de DNA teste na região cromossômica que está sendo analisada (Figura 29.1). Uma razão de intensidade de fluorescência maior de Cy3 (DNA referência, normal), quando comparada com Cy5, sugere uma perda de sequências de DNA ou deleção de sequências de DNA teste na região-alvo (Figura 29.1). A capacidade de detecção de alterações do experimento vai depender da resolução da plataforma de DNA utilizada.

As principais vantagens da técnica de aCGH, se comparada com as técnicas de citogenética convencional e outros métodos de citogenética molecular, são:

- O DNA genômico inteiro pode ser analisado em um único experimento.
- A sensibilidade e a especificidade são bastante altas.

Embora aCGH tenha provado ser uma técnica eficiente e reproduzível, a configuração estrutural de uma aberração cromossômica não pode ser caracterizada. A ordem e a orientação dos segmentos rearranjados em uma alteração cromossômica não podem ser determinadas, não sendo possível diferenciar um poliploidia de um cariótipo normal, e níveis muito baixos de mosaicismos podem ser difíceis de serem detectados. Estas limitações dependem do princípio geral da metodologia, enquanto que o desempenho de um experimento utilizando aCGH depende também do tipo de plataforma a ser empregada.

Diferentes plataformas para aCGH têm sido desenvolvidas na última década.<sup>3-4</sup> BAC/PAC *arrays* com uma resolução de 1 Mb têm sido os mais frequentemente utilizados para estudos de hibridização genômica comparativa em indivíduos com atraso mental e/ou distúrbios ou atraso mental e/ou malformações congênitas de causa desconhecida.<sup>5-13</sup> Recentemente, outras plataformas de *arrays* de maiores resoluções têm sido amplamente utilizadas para estudos de aCGH, incluindo oligonucleotídeos<sup>14</sup> e SNP *arrays*, com uma resolução teórica que permite a detecção de alterações na sequência de DNA de até 6 Kb. Plataformas de DNA que permitem a análise

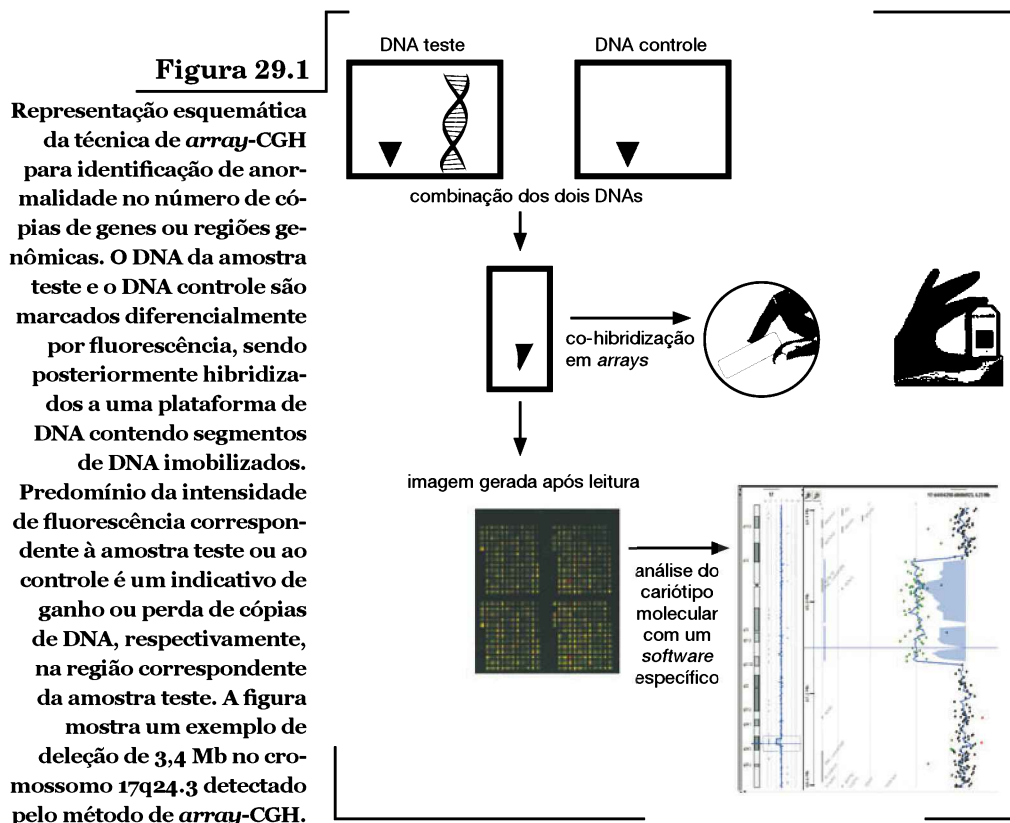
por aCGH de regiões cromossômicas específicas (p. ex., *arrays* apenas para regiões cromossômicas subteloméricas ou regiões cromossômicas relacionadas a síndromes de microdeleção) também têm sido desenvolvidas e utilizadas para pesquisa e diagnóstico.<sup>2</sup>

## Aplicações de *array*-CGH em genética clínica

Atualmente, o método de aCGH tem sido amplamente utilizado na análise de pacientes com fenótipos complexos. Devido a vários estudos publicados com dados referentes a alterações submicroscópicas envolvendo as regiões subteloméricas em pacientes com retardo mental e com ou sem múltiplas malformações congênitas de causas desconhecidas, uma das primeiras aplicações da aCGH foi o rastreamento de rearranjos subteloméricos.<sup>15-18</sup> Desde que o cariótipo convencional se tornou um exame de rotina, essa condição clínica tem sido associada com rearranjos cromossômi-

cos. Entretanto, a maioria dos pacientes cujo material é analisado apenas por métodos de citogenética convencional possui um resultado de cariótipo normal, não sendo possível detectar as alterações cromossômicas desbalanceadas presentes em mais de 10% dos indivíduos com retardo mental e malformações congênitas.<sup>19-22</sup> Estas alterações estão abaixo do nível de resolução dos métodos de citogenética convencional. Rastreamentos do genoma humano utilizando a técnica de aCGH em indivíduos com retardo mental e/ou anomalias congênitas (que apresentam um cariótipo convencional normal) demonstram alterações submicroscópicas crípticas (deleções, duplicações ou ambas as alterações) entre 20 e 25% dos indivíduos afetados, dependendo do critério clínico de seleção.<sup>5,6,8-11,23,24</sup>

A análise do genoma por aCGH é de grande importância para investigar a presença de deleções e duplicações. O impacto da utilização deste método é de particular relevância na identificação de um *locus* ou de *loci* específicos relacionados com síndromes de mal-



formações esporádicas. Vissers e colaboradores,<sup>24</sup> utilizando esta abordagem, descobriram que a síndrome de Charge ocorre devido a uma haploinsuficiência do gene CHD7, demonstrando a eficácia do método de aCGH na localização de genes causadores de determinadas doenças.<sup>5,25,26</sup> Vissers e colaboradores<sup>5</sup> avaliaram 20 pacientes com atresia congênita, com o objetivo de localizar o gene responsável por essa malformação. Nesse estudo, foi feito um mapeamento exclusivo utilizando um BAC *array* específico para o cromossomo 18.<sup>27</sup> Os autores identificaram uma região crítica de 5 Mb localizada no cromossomo 18q22.3-q23. A mesma abordagem foi utilizada na tentativa de localizar genes relacionados a outras síndromes esporádicas, como por exemplo a síndrome de Kabuki.<sup>28</sup>

*Tiling path arrays* têm sido utilizados no mapeamento e na determinação do tamanho de determinados segmentos específicos de aberrações cromossômicas, permitindo uma acurada correlação genótipo-fenótipo.<sup>29,30</sup> Yu e colaboradores<sup>31</sup> utilizaram um *tiling path array* em pacientes com a síndrome de deleção 1p36. Este *array*, contendo 10 Mb da região terminal 1p, permitiu a classificação correta dos pacientes com base na sua alteração cromossômica (deleção terminal, deleção intersticial ou cromossomo derivado).

O método de aCGH tem sido amplamente utilizado para investigar pacientes com alterações cromossômicas aparentemente balanceadas e fenótipo anormal. Nesses indivíduos, o fenótipo anormal poderia ser explicado pela disrupção de um gene, um efeito de posição, uma alteração críptica desbalanceada no ponto de quebra onde ocorreu a alteração cromossômica ou em outra região do genoma. O método *tiling path* aCGH é bastante adequado para a identificação de alterações desbalanceadas nos pontos de quebra envolvidos em uma aberração cromossômica.

---

## Array-CGH e variação do número de cópias (CNV) no genoma humano

Um importante objetivo na descoberta de novos genes é a identificação de uma ou mais regiões cromossômicas associadas a um fenótipo específico. Variações do número de

cópias (CNVs) de genes podem ocorrer em um espectro variado de doenças. Assim, a detecção e o mapeamento de alterações do número de cópias de certas regiões do genoma oferecem uma importante contribuição para a associação entre defeitos moleculares e o fenótipo estudado. O método de aCGH tem sido bastante empregado no rastreamento ao longo do genoma de defeitos cromossômicos que podem representar a evidência inicial para a identificação de um ou mais genes associados a doenças genéticas.

Estima-se que cerca de 5% do genoma humano sejam representados por duplicações de segmentos.<sup>32</sup> Duplicações segmentais são alongamentos de sequências de DNA menores ou iguais a 1 a 5 kb com mais de 90% de sequências conservadas que estão presentes em mais de um ponto no genoma.<sup>33</sup> Duplicações segmentais provavelmente sejam compostas de sequências gênicas com íntrons e éxons, bem como sequências repetitivas, como elementos de Alu e L1, e parecem ser “DNA normal”. Duplicações podem ser intra ou entre cromossomos, se estiverem presentes em cromossomos homólogos.<sup>32</sup> Observe-se que existe uma associação significativa entre a localização de duplicações segmentais e regiões de instabilidade cromossômica ou rearranjos evolucionários.<sup>34</sup> A arquitetura das duplicações do genoma humano deve medir, além de rearranjos patogênicos recorrentes, também variações normais do DNA.<sup>35,36</sup>

A variação no genoma humano está presente em muitas formas, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo, polimorfismos de pequenas inserções-deleções, número variável de sequências repetitivas e alterações estruturais genômicas, que são largas duplicações e deleções.<sup>37</sup> Estudos moleculares e citogenéticos permitiram a identificação de diversas variações no genoma humano. Entretanto, apenas recentemente tem sido possível o estudo de CNVs submicroscópicas. Geralmente, elas possuem um tamanho entre 1 kb e 3 Mb. A frequência de CNVs no genoma humano, assim como qual é a sua contribuição para a diversidade humana, até o presente momento ainda não está bem definida. O desenvolvimento de técnicas de mapeamento do genoma para CNVs em populações normais tem gerado dados das variações estruturais na população global.<sup>38-41</sup> Se a frequência de uma va-

riação é de  $> 1\%$ , é chamada de polimorfismo do número de cópias (CNP). Alguns autores estudaram a frequência de CNPs em indivíduos normais.<sup>38,42</sup> Sharp e colaboradores<sup>34</sup> utilizaram um *microarray* de duplicações segmentais para investigar CNVs em indivíduos controle de diferentes etnias. Esse BAC *array* cobriu 130 regiões do genoma potencialmente instáveis chamadas de “*hot spots* de rearranjos”, definidas pela presença de duplicações segmentais intracromossômicas de  $> 10$  kb e com um alto grau de homologia ( $> 95\%$ ). O uso de *arrays* específicos permitiu a confirmação de dados anteriores já publicados e a determinação de rearranjos estruturais. Esses dados confirmam que as duplicações do genoma estão fortemente associadas com CNPs no genoma humano.

A presença de um número de CNPs que estão presentes, quase sem exceção, em muitas populações assume uma grande importância quando diagnosticada por aCGH. Nestas situações, apresentam-se dificuldades em se diferenciar entre CNVs herdadas, as quais pode-

riam ou não ser a causa de um fenótipo anormal, e variações raras não relacionadas com alterações clínicas.<sup>43</sup> Isso poderia representar uma limitação do uso de aCGH no diagnóstico clínico, dificultando um aconselhamento genético. Entretanto, já existem vários bancos de dados disponíveis contendo informações de variabilidade genômica em indivíduos normais (veja no final das referências).

A incidência de pequenas alterações cromossômicas desbalanceadas em diferentes grupos de pacientes com doenças genéticas ainda é desconhecida. Estudos adicionais com aCGH de alta resolução são necessários para estabelecer um diagnóstico em um número indefinido de pacientes em diferentes centros de genética em nível mundial. O estabelecimento laboratorial adequado do método de aCGH, em conjunto com uma caracterização clínica e citogenética bem definida do paciente, é necessário para aumentar a possibilidade de identificação e determinação de alterações desbalanceadas no genoma, levando a uma correlação correta genótipo-fenótipo.

## Referências

1. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2007 Nov;15(11):1105-14.
2. Veltman JA. Genomic microarrays in clinical diagnosis. *Curr Opin Pediatr*. 2006 Dec;18(6):598-603.
3. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407.
4. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):207-11.
5. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003 Dec;73(6):1261-70.
6. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 2004 Apr;41(4):241-8.
7. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet*. 2005 Sep;42(9):699-705.
8. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Asano J, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2006 Sep;79(3):500-13.
9. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet*. 2006 Aug;43(8):625-33.
10. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected



- children and normal parents. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):180-6.
11. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J.* 2007 Nov;28(22):2778-84.
12. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 2007 Jul 1;143A(13):1431-41.
13. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet.* 2006 Jun;43(6):512-6.
14. Miller DT, Shen Y, Wu BL. Oligonucleotide microarrays for clinical diagnosis of copy number variation. *Curr Protoc Hum Genet.* 2008 Jul;Chapter 8:Unit 8.12.
15. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2002 May;70(5):1269-76.
16. Knight SJ, Flint J. The use of subtelomeric probes to study mental retardation. *Methods Cell Biol.* 2004;75:799-831.
17. Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Jun;13(3):310-6.
18. Kok K, Dijkhuizen T, Swart YE, Zorgdrager H, van der Vlies P, Fehrmann R, et al. Application of a comprehensive subtelomere array in clinical diagnosis of mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2005 Jul-Sep;48(3):250-62.
19. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet.* 1995 Feb;9(2):132-40.
20. Knight SJ, Flint J. The use of subtelomeric probes to study mental retardation. *Methods Cell Biol.* 2004;75:799-831.
21. Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, et al. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet.* 2000 Aug;67(2):320-32. Epub 2000 Jun 22.
22. Biesecker LG. The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet.* 2002;107(4):263-6.
23. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2005 Oct;77(4):606-16.
24. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Jan;1151:157-66.
25. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):955-7.
26. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet.* 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R215-23.
27. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem.* 2005 Mar;53(3):413-22.
28. Schoumans J, Nordgren A, Ruivenkamp C, Brøndum-Nielsen K, Teh BT, Annéren G, et al. Genome-wide screening using array-CGH does not reveal microdeletions/microduplications in children with Kabuki syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005 Feb;13(2):260-3.
29. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet.* 2006 Jun;43(6):512-6. Epub 2005 Sep 23.
30. Glass IA, Rauen KA, Chen E, Parkes J, Alberston DG, Pinkel D, et al. Ring chromosome 15: characterization by array CGH. *Hum Genet.* 2006 Jan;118(5):611-7.
31. Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, et al. Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 1;12(17):2145-52.
32. Bailey JA, Yavor AM, Viggiano L, Misceo D, Horvath JE, Archidiacono N, et al. Human-specific duplication and mosaic transcripts: the recent paralogous structure of chromosome 22. *Am J Hum Genet.* 2002 Jan;70(1):83-100.
33. Snijders AM, Nowak NJ, Huey B, Fridlyand J, Law S, Conroy J, et al. Mapping segmental and sequence variations among laboratory mice using BAC array CGH. *Genome Res.* 2005 Feb;15(2):302-11.
34. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, et al. Segmental duplications and

copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):78-88.

35. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 2005 Dec;1(6):e49.
36. Alkan C, Kidd JM, Marques-Bonet T, Aksay G, Antonacci F, Hormozdiari F, et al. Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1061-7.
37. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):949-51.
38. Feuk L, MacDonald JR, Tang T, Carson AR, Li M, Rao G, et al. Discovery of human inversion polymorphisms by comparative analysis of human and chimpanzee DNA sequence assemblies. *PLoS Genet.* 2005 Oct;1(4):e56.
39. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet.* 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R57-66.
40. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85-97.
41. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
42. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* 2005 Jul;37(7):727-32.
43. de Ravel TJ, Balikova I, Thienpont B, Hannes F, Maas N, Fryns JP, et al. Molecular karyotyping of patients with MCA/MR: the blurred boundary between normal and pathogenic variation. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):225-30.

## Leituras recomendadas

Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009 Mar;11(3):139-46.

Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):1032-7.

Visser LELM, de Vries BBA, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2002 May;70(5):1269-76.

Weiss MM, Kuipers EJ, Postma C, Snijders AM, Stolte M, et al. Genome wide array comparative genomic hybridisation analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol.* 2003 Oct;56(5):293-8.

## Banco de dados para consulta de variações estruturais do Genoma Humano

Database of genomics variants [Internet]. Toronto, ON: Department of Genetics and Genomic Biology, MaRS Centre; c2010. Disponível em: <http://projects.tcag.ca/variation/>.

DECIPHER [Internet]. [Local desconhecido]: Trust Sanger Institute; c2010. Disponível em: <http://decipher.sanger.ac.uk/>. [acesso restrito]

Ensembl genome browser. Homo Sapiens [Internet]. Cambridge: EBI, EMBL, c2010. Disponível em: [http://ensembl.genomics.org.cn:8058/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://ensembl.genomics.org.cn:8058/Homo_sapiens/Info/Index).

European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations [Internet]. [local desconhecido]: ECARUCA; c2010. Disponível em: [www.ecaruca.net](http://www.ecaruca.net).

The National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda, MD: NCBI, U.S. National Library of Medicine; c2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

# Diagnóstico pré-natal das anomalias citogenéticas

## Introdução

O diagnóstico pré-natal (DPN) é um conjunto de procedimentos e técnicas que permite a detecção de anomalias embrionárias e fetais. Ele envolve atividades clínicas (avaliação obstétrica, aconselhamento genético pré-natal, acompanhamento psicológico), exames de imagem (ultrassom, ecocardiografia fetal), procedimentos invasivos (amniocentese, biópsia de vilo, cordocentese), técnicas laboratoriais (citogenética, investigação metabólica, análise molecular, pesquisa de infecções congênitas) e pode envolver também o exame anatomopatológico.

Para todas as gestantes, rotineiramente costumam ser oferecidos exames que permitem avaliar a saúde do feto, como a ultrassonografia. Quando são identificadas ou se suspeita de alterações fetais, torna-se necessária a realização de investigação genética adicional para esclarecimento do diagnóstico. Por outro lado, algumas gestações envolvem um risco maior de anormalidade fetal já previamente conhecido pela história familiar ou por exposições maternas crônicas, estando indicado um procedimento específico para DPN.

O DPN idealmente deve ser uma atividade multiprofissional, da qual fazem parte obstetras, geneticistas clínicos, neonatologistas, enfermeiras, psicólogos, cardiologistas pediátricos, citogeneticistas, bioquímicos e patologistas.<sup>1</sup>

## Aconselhamento genético no diagnóstico pré-natal

Aconselhamento genético é definido como um processo que possibilita que pacientes e familiares em risco para uma doença que pode ser genética sejam informados das consequências desta doença, da probabilidade de desenvolvê-la e transmiti-la, e das alternativas terapêuticas e preventivas.<sup>2</sup>

O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as doenças genéticas intraútero mudou a perspectiva reprodutiva das famílias de risco e tornou o DPN uma parte integrante do processo de aconselhamento genético.

Na **Tabela 30.1** são apresentadas as principais indicações para a realização de aconselhamento genético pré-natal.

O momento ideal para o aconselhamento genético com vistas ao diagnóstico pré-natal é antes da concepção, permitindo a preparação prévia da investigação indicada para cada caso.<sup>2,3</sup>

Para que se possa oferecer DPN específico em casos de história familiar de anormalidades, é necessário estabelecer o diagnóstico preciso da patologia em risco no caso índice. Algumas vezes, são indicados exames adicionais para o casal, como cariótipo ou estudos moleculares. A partir daí, discutem-se os métodos de DPN disponíveis, os riscos e os custos envolvidos no procedimento indicado,

assim como as alternativas decorrentes de um DPN anormal.

Na consulta de aconselhamento genético, alguns aspectos importantes devem ser abordados com o casal antes da realização de exames invasivos, tais como o exame disponível e como ele será realizado, qual o tempo de espera até o resultado, qual(is) diagnóstico(s) pode(m) ser obtido(s) através deste exame, os riscos envolvidos na realização de um procedimento invasivo e as consequências de um resultado anormal.<sup>4</sup>

A comunicação de um resultado anormal é uma das etapas mais difíceis do processo. A elaboração e a tomada de decisão são facilitadas quando o casal foi adequadamente informado, em uma sessão prévia de aconselhamento genético, da possibilidade de ocorrência da anormalidade e das consequências do problema, e já refletiu sobre as diversas possibilidades envolvidas.

Em todos os casos em que for identificada uma anormalidade fetal, a confirmação pós-natal dos achados pré-natais é muito importante para estabelecer o diagnóstico exato da patologia fetal. Um grande número de anormalidades fetais é de ocorrência esporádica, permitindo tranquilizar o casal quanto ao seu futuro reprodutivo. Por outro lado, o risco de

recorrência pode ser elevado em condições gênicas ou alterações cromossômicas familiares.

O fator mais importante nas decisões reprodutivas de casais que passaram por aconselhamento genético após terem tido um filho com uma anormalidade genética, multifatorial ou relacionada é o risco estimado de recorrência.<sup>5</sup> Assim, a finalização de um processo de aconselhamento genético pré-natal deve incluir a avaliação do desfecho da gestação, com exame do recém-nascido ou, em caso de perda gestacional, exame anatomopatológico ou necropsia. Isto é especialmente importante em casais sem risco prévio e que foram avaliados por anormalidades fetais detectadas durante a gestação. Ademais, isso pode permitir a readequação do risco estimado para aquele casal, contribuindo para o planejamento familiar.

## Triagem ou rastreamento ultrassonográfico de primeiro trimestre e medida da translucência nucal

A translucência nucal é um teste de rastreio de risco gestacional para cromossomopatias (trissomias 21, 18 e 13), podendo rastrear tam-

**TABELA 30.1**

Principais indicações para aconselhamento genético pré-natal

Indicações prévias à gestação
Idade materna avançada
História familiar ou pessoal de cromossomopatia
História familiar ou pessoal de síndrome gênica
História familiar ou pessoal de doenças metabólicas
História familiar ou pessoal de malformações congênitas
Perdas gestacionais repetidas
Consanguinidade
Exposição a teratógenos (ocupacional, doença materna crônica)
Indicações da própria gestação
Triagem sérica alterada
Rastreamento ultrassonográfico de alterado
Malformação fetal
Cardiopatia fetal
Exposição a teratógenos

bém síndrome de Turner, triploidia e outras anomalias cromossômicas.

Pela medida do subcutâneo da nuca do feto, entre 11 e 14 semanas de idade gestacional (comprimento cabeça-nádega: 45 a 84 mm), pode-se selecionar pacientes para exames invasivos, como biópsia de vilosidades coriônicas (BVC) ou amniocentese, com base na correlação da espessura nuchal aumentada e trissomias. Os cálculos de risco estão calculados em mais de 100 mil exames analisados. O resultado deve ser emitido em um número de probabilidade, levando-se em consideração a idade materna, o tempo de gestação, os antecedentes obstétricos e a medida da translucência nuchal. O exame não apresenta risco de perda da gravidez, sendo realizado apenas por uma ultrassonografia, indicado principalmente em pacientes de baixo risco pela idade, com menos de 35 anos.<sup>6</sup>

Uma série de anormalidades fetais como defeitos cardíacos, hérnia diafragmática, onfalocoele, malformações esqueléticas, anomalias renais, uropatia obstrutiva e diversas doenças gênicas já foram descritas em associação à translucência nuchal aumentada em fetos com cariótipo normal.<sup>7,8</sup>

A prevalência de anormalidades fetais e desfechos gestacionais adversos aumenta exponencialmente com a espessura da translucência nuchal a partir de 3,5 mm. A possibilidade do nascimento de um bebê normal é de 70% com uma medida de 3,5 a 4,4 mm, e de 15% a partir de 6,5 mm. Entretanto, uma vez que seja descartada cromossomopatia, e que o feto não apresente alterações morfológicas em torno de 20 a 22 semanas, o risco de um desfecho perinatal adverso ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor não está significativamente aumentado.<sup>9</sup>

Novos marcadores ultrassonográficos vêm sendo descritos para identificação de gestações em risco para cromossomopatia, como a medida do osso nasal. No primeiro trimestre, o osso nasal está ausente em 70% dos fetos com síndrome de Down, em 10% da população de origem africana e em menos de 1% dos fetos cromossomicamente normais na população caucasiana. Para o bom desempenho deste marcador na triagem de gestações em risco para síndrome de Down, é fundamental o treinamento adequado dos ultrassonografistas.<sup>10</sup>

Outra abordagem para identificar gestações com risco elevado de cromossomopatias é a avaliação de marcadores bioquímicos no soro materno. A triagem combinada através de idade materna, translucência nuchal e marcadores séricos de primeiro trimestre ( $\beta$ -HCG e PAPP-A) identifica 90% das gestações com trissomia 21, com uma taxa de falso-positivo de 5%.<sup>11</sup>

## Procedimentos invasivos

Os métodos invasivos em DPN viabilizam a coleta direta de material fetal para análise em laboratório, permitindo a realização de diversos exames, como o cariótipo para doenças cromossômicas, os ensaios enzimáticos para erros inatos do metabolismo e a análise molecular para doenças gênicas.

Os principais procedimentos invasivos são a BVC, a amniocentese e a cordocentese. Existem outros procedimentos alternativos, como punção de bexiga e punção intracardiaca; entretanto, estes métodos não são utilizados de rotina, sendo reservados para situações especiais.

A BVC consiste na retirada de fragmentos de placenta através de uma agulha guiada por ultrassonografia. A via preferencial é a transabdominal. A BVC pode ser realizada entre 11 e 14 semanas, e tem um risco de abortamento de 1 a 1,5%. O material coletado pode ser analisado diretamente e após cultivo, sendo utilizado para estudo citogenético, ensaio enzimático e análise molecular.

A amniocentese é a retirada de 20 mL de líquido amniótico por agulha, guiada por ultrassonografia. Ela pode ser realizada com segurança a partir de 15 semanas e tem um risco de abortamento de 0,5 a 1%. O material utilizado para análise são as células fetais flutuantes no líquido e as enzimas que o compõem.

A cordocentese é a punção de vaso umbilical para retirada de amostra de sangue fetal. Uma agulha guiada por ultrassonografia é introduzida na cavidade amniótica e depois punciona o vaso. Este procedimento é utilizado a partir de 18 semanas de idade gestacional, para confirmação de um resultado duvidoso na amniocentese ou na ausência de líquido amniótico. O risco de perda fetal é de 2 a 5%.

A gestante poderá, dentro de até 48 horas após qualquer dos exames invasivos, sofrer perda de líquido amniótico e sangramento, podendo ocorrer contrações. Por este motivo, está indicado repouso absoluto após o procedimento, pelo menos durante o dia de realização do exame, e redução das atividades físicas por até 72 horas. A perda fetal é a complicação mais grave destes procedimentos.

Como todos esses procedimentos oferecem riscos, é muito importante que, ao serem indicados aos casais, tenha sido realizada previamente uma consulta de aconselhamento genético. É importante que a indicação de um procedimento invasivo seja criteriosa para não expor as pacientes a situações temerárias sem benefício. As principais indicações para amniocentese ou coleta de vilosidades são apresentadas na **Tabela 30.2**.

A frequência das anormalidades cromossômicas é especialmente elevada nos casos de malformação fetal.<sup>12</sup> A **Tabela 30.3** mostra as frequências das anormalidades cromossômicas distribuídas de acordo com a indicação. A maior frequência de anormalidades cromossômicas se encontra no grupo onde a indicação para o exame são as malformações fetais encontradas no ultrassom.

## Detecção de cromossomopatias fetais

### Cariótipo fetal

O estudo citogenético do feto através do cariótipo fetal pode ser obtido a partir de

amniócitos cultivados ou por estudo direto ou após cultivo das vilosidades coriônicas. Isso permite a identificação de anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais. A frequência de cromossomopatias é elevada na espécie humana, sendo detectadas em 0,5% dos recém-nascidos, 5% dos natimortos e 50% dos abortos.<sup>13</sup> As principais indicações para a detecção pré-natal de cromossomopatias são apresentadas na **Tabela 30.3**.

### Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Esta técnica é o produto da combinação da citogenética tradicional com a biologia molecular, que iniciou na década de 1980 em alguns laboratórios selecionados do primeiro mundo, e teve grande aplicabilidade no diagnóstico clínico. Ela permite que sequências de DNA sejam detectadas em metáfases ou em núcleos interfásicos na própria lâmina. Isto é, não há extração de DNA: ele é estudado diretamente no núcleo ou no cromossomo. Tanto o DNA-alvo como a sonda marcada com material fluorescente são desnaturados (a dupla hélice abre com o calor). A sonda e o DNA-alvo hibridizam. Com um microscópio de fluorescência e filtros adequados, é possível visualizar as sequências marcadas e hibridizadas. A grande vantagem desta técnica é que entre 24 e 48 horas se pode obter o diagnóstico prévio de algumas cromossomopatias, como trissomias 13, 18 e 21, bem como de cromossomos sexuais. A detecção apenas destas alterações abrange 90% das cromossomopatias.<sup>14</sup> Para as gestantes

**TABELA 30.2**  
Principais indicações para coleta de vilosidades coriônicas ou amniocentese

Idade materna avançada (acima de 35 anos) <sup>a</sup>
Filho com cromossomopatia
Pais portadores de translocações cromossômicas
Filho com erro inato do metabolismo
Doenças gênicas com diagnóstico molecular possível
Translucência nuchal aumentada
Malformação fetal na ecografia
Triagem sérica alterada
Hidropsia fetal não imune

<sup>a</sup> A definição de idade materna avançada varia nos diversos centros. No HCPA considera-se indicada amniocentese para gestantes a partir dos 38 anos de idade.

que normalmente são ansiosas ou de risco, isto é de grande valor.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização genômica comparativa (CGH)

A PCR (de *polymerase chain reaction*) pode ser utilizada como um método molecular alternativo para a detecção das cromossomopatias mais comuns (13, 18, 21 e cromossomos sexuais), tendo como base uma técnica amplamente difundida da PCR, onde através da amplificação de pequenas sequências de DNA (*STRs*, de *short tandem repeats*) pode-se obter o diagnóstico de uma alteração quantitativa no material em algumas horas. A interpretação da quantificação dos alelos se dá por um *software*, onde picos gráficos representam os alelos (dois picos equivalem a dois alelos nor-

mais na proporção de 1:1 e três picos indicam uma trissomia na proporção de 1:1:1 ou 2:1).

Outra técnica molecular que também é utilizada para a detecção de cromossomopatias é a CGH (de *comparative genomic hybridization*), onde todo o genoma do paciente hibridiza com o genoma teste em uma única reação. Recentemente, foi descrita a possibilidade de diagnosticar aneuploidias e determinar o sexo fetal em líquido amniótico sem células, analisando o DNA livre no sobrenadante, através de *microarrays* e CGH.<sup>15</sup>

Tanto a FISH como a PCR e a CGH são consideradas testes de detecção rápida de aneuploidias (RAD, de *rapid aneuploidy diagnosis*) que, se por um lado podem aliviar (ou não) a gestante, por outro devem ser confirmados posteriormente com a análise do cariótipo tradicional. Este ainda é considerado o teste padrão-ouro para a detecção de aber-

TABELA 30.3  
Indicações para a realização de procedimentos invasivos e cariótipos anormais

Indicação primária	Número total de casos (%)	Cariótipos obtidos (n)	Cariótipos anormais (%)	Tipo de anormalidade (n)
Idade materna avançada	235 (25,9)	227	13 (5,7)	Trissomia 21 (10) Trissomia 18 (3)
Malformação fetal no ultrassom – não incluindo a translucência nugal	177 (19,5)	169	38 (22,5)	Trissomia 18 (19) Trissomia 21 (9) Trissomia 13 (4) 47,_,+mar (2) 45,X (1) Triploidia (1) 46,XX+13,der(13;14)(q10;q10) (1) 46,XY,del(18)(p?) (1)
Filho anterior com trissomia	125 (13,8)	123	0	0
Translucência nugal aumentada	65 (7,1)	63	9 (14,3)	Trissomia 21 (8) 47,XY,+mar(1)
Hidropsia fetal não imune	54 (5,9)	50	10 (20)	45,X (4) Trissomia 13(2) Trissomia 18(2) Trissomia 21(1) 46,XY,+14,der(14;21)(q10;q10)(1)
Outras indicações	249 (27,5)	247	4 (1,6)	46,XX,+der(18)add(18)(p11)(1) 46,XX, t(15;16)(q21;p12)(1) 46,XX,inv(12)(q13q23)(1) 46,XY, t(7;10)(p21;q21)(1)
Total	905	879	74 (8,4)	

Fonte: Adaptada de Kessler e colaboradores.<sup>12</sup>



rações cromossômicas. Os testes rápidos não detectam alterações estruturais (balanceadas ou não), nem mosaicismos, e podem falhar (falso-negativos) em 1% dos casos.<sup>16</sup>

## Considerações finais

O diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas é um importante recurso

para gestantes com história familiar de cromossomopatia ou com detecção de anomalia fetal na ultrassonografia. O diagnóstico etiológico do feto é uma ferramenta essencial para o aconselhamento genético, permitindo estabelecer o prognóstico da gestação em curso, o planejamento do parto, bem como estimar o risco de uma futura gestação, garantindo o apoio necessário para o casal.

## Referências

1. Sanseverino MT, Kessler RG, Burin MG, Stein NR, Herman RF, Matte U, et al. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. *Rev HCPA*. 2001 Dez;21(3):301-16.
2. Harper PS. *Practical genetic counselling*. 3rd ed. London: Wright; 1988.
3. Milunsky A, Milunsky J. Genetic counseling: preconception, prenatal, and perinatal. In: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus*. 4th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1998. p.1-52.
4. Waurin J. Genetic counseling: prenatal counseling of an abnormal finding. *J Assoc Genet Technol*. 1998 May-Jun;24(3):81-3.
5. Pina-Neto JM, Petean EBL. Genetic counseling follow-up: a retrospective study with a quantitative approach. *Genet Mol Biol*. 1999 Sept; 22(3):295-307.
6. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ*. 1992 Apr 4;304(6831):867-9.
7. Souka AP, Krampl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Jul;18(1):9-17.
8. Hiippala A, Eronen M, Taipale P, Salonen R, Hiilesmaa V. Fetal nuchal translucency and normal chromosomes: a long-term follow-up study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Jul;18(1):18-22.
9. Souka A, von Kaisenberg C, Nicolaides K. Increased nuchal translucency: the 11-14 weeks scan. London: Fetal Medicine Foundation; 2004. p. 61-80.
10. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):45-67.
11. Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Jun;31(6):618-24.
12. Kessler RG, Sanseverino MTV, Leistner-Segal S, Magalhães JAA, Giugliani R. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities: report of an 18-year experience in a Brazilian public hospital. *Genet Mol Biol*. 2008 Sept-Dec; 3(4):829-33.
13. Boué J, Boué A. Evaluation des erreurs chromosomiques au moment de la conception. *Biomedicine*. 1973 Sep;18(5):372-4.
14. Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*. 1998 Dec;18(13):1459-66.
15. Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, Lucas M, Wilber K, LeShane ES, et al. Microarray analysis of cell free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet*. 2004 Sep;75(3):485-91.
16. Bui TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon! *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007 Sep;30(3):247-51.



# Alterações citogenéticas na infertilidade e nos abortamentos de repetição

## Introdução

Neste capítulo, serão abordadas as principais cromossomopatias relacionadas com infertilidade, como a síndrome de Klinefelter em homens e a síndrome de Turner em mulheres. Serão também revisadas as principais alterações citogenéticas relacionadas aos abortos e as anormalidades citogenéticas em casais com abortamento de repetição.

## Infertilidade relacionada a cromossomopatias

A infertilidade, primária ou secundária, está presente em cerca de 10% dos casais, por etiologias variadas, incluindo fatores masculinos, fatores femininos e infertilidade sem causa aparente. As anormalidades genéticas, incluindo as anormalidades cromossômicas, são responsáveis por uma parcela significativa dos casos.

Na infertilidade masculina, a frequência de alterações cromossômicas está em torno de 13,7% nos homens com azoospermia não obstrutiva e 4,6% nos homens oligospermicos, sendo as alterações mais frequentes a síndrome de Klinefelter e as translocações cromossômicas balanceadas.

A seguir, são revisadas as principais alterações cromossômicas que se relacionam com infertilidade masculina e feminina.

## Síndrome de Klinefelter

A síndrome de Klinefelter (cariótipo 47,XXY) apresenta uma prevalência elevada, correspondendo a 1/600 a 1/800 homens. Em aproximadamente 50% dos casos, o cromossomo X adicional tem origem paterna. Por outro lado, a frequência da síndrome está relacionada diretamente à idade materna, sendo de 1/2.500 e 1/300 recém-nascidos (RNs) vivos em mães de 33 e 43 anos, respectivamente.

Esta síndrome costuma ser detectada como um achado inesperado em amniocentese para diagnóstico pré-natal (DPN) citogenético por idade materna avançada e em homens em investigação de infertilidade.

Os principais achados clínicos são criptorquidia, tendência à alta estatura (média 186 cm em relação 177 cm para 46,XY) e ginecomastia transitória. A entrada na puberdade ocorre normalmente, podendo posteriormente ocorrer involução dos testículos com hipogonadismo hipergonadotrófico e diminuição da produção de testosterona. A genitália é normal, exceto por diminuição no volume dos testículos, e o desempenho sexual é normal.

O tratamento precoce com testosterona corrige a deficiência de andrógenos, evitando sintomas e sequelas, mas não tem efeito positivo sobre a fertilidade.<sup>1</sup>

Com raríssimas exceções, os homens 47,XXY são inférteis, sendo provável que haja mosaïcismo nos raros homens espontaneamente férteis.

Os homens com síndrome de Klinefelter podem se beneficiar da reprodução assistida, utilizando a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Em alguns casos, é possível identificar espermatozoides no ejaculado; para a maioria dos casos será necessária a aspiração de espermatozoides diretamente do testículo (TESA), que tem sido possível em cerca de 50% dos casos de homens 47,XXY.

Diversos estudos de análise cromossômica de espermatozoides obtidos de homens 47,XXY por técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), evidenciam uma frequência elevada de aneuploidias sexuais e de autossomos. O mecanismo não está claro, mas é sugerido que a presença do cromossomo X adicional interfira diretamente com a meiose. Outros autores sugerem que o ambiente testicular comprometido nos homens 47,XXY seja responsável pelos erros meióticos.

Por essa razão, está indicado o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, de *preimplantation genetic diagnosis*) com FISH para os cromossomos X, Y, 13, 18, 21 e 22 em embriões de homens com síndrome de Klinefelter resultantes de ICSI. Vários relatos e séries de caso de PGD em homens com a síndrome mostram uma frequência elevada de aneuploidias nos embriões testados.

Um estudo comparou a frequência de aneuploidias em 118 embriões submetidos a PGD de homens 47,XXY em relação a 578 embriões controle testados para sexagem por doenças ligadas ao X.<sup>2</sup> Foi encontrada uma frequência maior de aneuploidias envolvendo os cromossomos sexuais 18 e 21, sendo que a frequência de embriões normais foi significativamente mais baixa (54%) em relação aos controles (77,2%), reforçando a indicação de PGD em procedimento de fertilização assistida para homens com síndrome de Klinefelter.

Outras opções reprodutivas devem ser discutidas com o casal, como a adoção e a fertilização assistida com espermatozoide de doador.

## Outras causas genéticas de infertilidade masculina

**Microdeleções do Y:** aproximadamente 10 a 15% dos homens com azoospermia

(ausência de espermatozoides no ejaculado) idiopática ou oligospermia severa (menos de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/mL) apresentam deleção do AZF (fator de azoospermia), sendo mais frequente a microdeleção AZFc que remove um fragmento de cerca de 4 Mb do braço longo do cromossomo Y. As microdeleções não são identificáveis pelas técnicas de citogenética convencional, sendo diagnosticadas por estudos moleculares.

É importante considerar que alterações monogênicas também contribuem para as causas genéticas de infertilidade masculina. Por exemplo, em 99% dos pacientes com fibrose cística por mutações no gene CFTR ocorre ausência congênita bilateral dos ductos deferentes.

## Síndrome de Turner

A síndrome de Turner (ST) afeta 1 em cada 2.500 bebês nascidos vivos do sexo feminino. Falência ovariana precoce e disgenesia gonadal são particularidades desta síndrome. A amenorreia primária, também característica, parece ser resultado de uma disfunção ovariana devido à degeneração anormal e rápida dos oócitos e folículos. A maioria das afetadas é infértil. O mosaicismos é frequente e observado quando diversos tecidos são testados. Pacientes com ST podem apresentar variações no cariótipo, além da linhagem 45,X como: um cromossomo X normal e outro com rearranjo estrutural, isocromossomo Xq (associado ou não a uma linhagem celular 45,X), deleção Xp, anel do X (pode não afetar a função ovariana e ser transmitido para a prole). Mosaicos 45,X/46,XY apresentam um problema adicional devido à presença do cromossomo Y, com risco de desenvolvimento de tumor maligno, sendo então indicada, de forma preventiva, a extirpação cirúrgica das gônadas.

Em estudos com casais inférteis são raras as pacientes 45,X não mosaico. Algumas mulheres com ST, utilizando gametas doados, tiveram gravidez em programas de reprodução assistida. Por outro lado, mosaicos de ST durante a puberdade possuem parte da função ovariana, mas apenas de 2 a 5% conseguem engravidar. Publicações recentes<sup>3</sup> têm indicado a preservação da fertilidade principalmente para adolescentes mosaico ST, por criopreservação de tecido ovariano e/ou oócitos antes que ocorra a falência ovariana.

Nos casos de mosaicismo para esta síndrome, ainda não se sabe ao certo qual é a influência da linhagem de células alteradas na fertilidade. Acredita-se que em mosaicismos baixos, com menos de 10% de células 45,X e sem o estigma clássico da doença, não ocorreram alterações na função reprodutiva.

Após o nascimento de uma criança ou aborto com ST, o risco de recorrência de aborto é bastante baixo. Mulheres com rearranjos estruturais do cromossomo X possuem um alto risco de recorrência, e o fenótipo do nascido pode ser grave ou, o que é mais comum, a gravidez pode ser letal para fetos masculinos. A gestação espontânea é rara – nestes casos, é indicado o acompanhamento pré-natal devido ao risco de trissomia 21 e 45,X. Durante a gravidez, as alterações cardíacas – características de parte das mulheres com ST – podem ser agravadas e causar a morte da paciente devido à ruptura da aorta.

## Outras causas de falência ovariana prematura

É importante mencionar que existem outras causas genéticas relacionadas à falência ovariana prematura, como mulheres com pré-mutações para a síndrome do X frágil e mutações nos genes dos receptores dos hormônios FSH e LH, que devem ser investigadas a partir de uma história familiar sugestiva.

## Outras aneuploidias sexuais

**Mulheres 47,XXX (síndrome do triplo X):** sua frequência é de 1/1.000 a 1/1.200 meninas, com efeito significativo da idade materna. Clinicamente, não ocorrem dismorfias e a síndrome não está relacionada a retardo mental. Na maioria dos casos, a fertilidade é preservada, e os filhos são cromossomicamente normais.

**Homens 47,XYY:** a presença de um cromossomo Y adicional ocorre em 1/1.000 RNs do sexo masculino. Não está relacionada a dismorfias, e a relação com alterações cognitivas leves a alterações de comportamento é controversa. A maioria dos homens 47,XYY é fértil, e não há aumento na frequência de anormalidades cromossômicas nos espermatozoides.

## Investigação citogenética em abortamentos

### Frequência de cromossomopatias em abortos espontâneos

Aborto é a perda espontânea do embrião ou feto antes da 20ª semana de gravidez. O abortamento é a principal complicação da gravidez, com uma incidência total – gravidez clínica e bioquímica (exame de  $\beta$ hCG positivo) – de 50% das gestações. Os abortos espontâneos ocorrem em até 30% das gestações clínicas (exame de  $\beta$ hCG positivo, presença de saco gestacional e batimentos cardíacos fetais) e em sua maioria antes do final do primeiro trimestre de gestação. Durante estes três meses, cerca de 70% dos abortos ocorrem antes das seis primeiras semanas de gestação. O abortamento é dito precoce quando acontece até a 12ª semana de gestação, e tardio entre a 13ª e a 20ª semana. A taxa de perda espontânea diminui com o desenvolver da gestação (**Tabela 31.1**).

A principal causa dos abortos espontâneos são alterações cromossômicas, cuja incidência é de até 50% nas perdas precoces, não tendo taxas significativas nas perdas tardias. Estudos utilizando hibridização genômica comparativa (CGH) e *array*-CGH encontraram taxas maiores de alterações cromossômicas (de 60-70%) em amostras de vilosidades coriônicas que não responderam ao cultivo celular. Cariótipos de materiais de aborto apresentam principalmente trissomias nos cromossomos autossomos 16, 22, 21, 18 e 13. Estas alterações normalmente estão associadas a não disjunção cromossômica durante a meiose. As monossomias e as trissomias também são encontradas, porém em menor frequência (**Tabela 31.2**). Na maioria das vezes, casais que sofreram um único abortamento espontâneo apresentam cariótipo normal.

O estudo citogenético do material de abortamento pode solucionar a causa da perda do embrião ou feto. Para a obtenção de metáfases, laboratórios especializados fazem o cultivo de vilosidades coriônicas ou de tecido fetal. O cultivo de restos ovulares, como também é chamado, muitas vezes é difícil ou impossibilitado devido à contaminação da amostra por fungos ou bactérias, ao longo tempo até chegar ao laboratório, à embalagem e à solução

**TABELA 31.1**

Incidência de interrupção precoce espontânea da gestação

Frequência de abortos	%
Total de gestações (incluindo gravidez bioquímica)	50-70
Total de gravidez clínica	25-30
< 6 semanas de gestação	18
6 a 9 semanas de gestação	4
> 9 semanas de gestação	3
Em primigestas	6-10
Risco após três abortos	25-30
Risco em mulheres acima de 40 anos	30-40

Fonte: Adaptada de Firth e colaboradores.<sup>4</sup>

(formol ou álcool) de transporte inadequadas. Para que a amostra chegue em condições de ser cultivada, o ideal é que seja enviada ao laboratório assim que possível, em frasco estéril com soro fisiológico e refrigerado. Todos estes cuidados são necessários para que o tecido chegue vivo ao seu destino. Em casos nos quais não ocorre crescimento celular, ainda é possível fazer a análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) ou FISH.

## Anormalidades cromossômicas relacionadas a abortamento recorrente

Diz-se que um casal tem abortos de repetição quando ocorrem três ou mais perdas

consecutivas. Abortos recorrentes (ARs) podem ser causados por fatores genéticos, anatômicos, endócrinos, imunológicos, infecciosos, trombofílicos e também devido a fatores inexplicáveis. Os ARs atingem de 1 a 2% das mulheres férteis.

Casais com histórico de infertilidade, abortos, natimortos ou nascimento de criança com múltiplas anomalias congênitas, com ou sem retardo mental, apresentam um grande índice de serem portadores de anomalias cromossômicas. Cerca de até 6% dos casais que sofrem de AR possuem alterações cromossômicas. Os ARs podem ser causados por anomalias estruturais cromossômicas em um dos genitores, ou seja, alterações que envolvem rearranjos sem que ocorra perda ou ganho de material genético, como as translocações e

**TABELA 31.2**

Porcentagem das alterações cromossômicas mais comuns detectadas em aborto espontâneo

Anomalia cromossômica	%
Trissomia de autossomo*	50
Triploidia (69,XXX, 69,XXY, 69,XYY)	15
45,X	10
Tetraploidia (92,XXXX ou 92,XXYY)	5
Alterações estruturais desbalanceadas (50% de novo)	4
Outras alterações	16

\* Trissomia 16 é muito comum, representando 30% das trissomias.

Fonte: Adaptada de Firth e colaboradores.<sup>4</sup>

inversões. Quando um dos pais é portador de um rearranjo cromossômico, a probabilidade de que ocorra aborto é de 25 a 50%.

A incidência de anormalidades cromossômicas é, em geral, maior nas mulheres do que nos homens. Na mulher, acredita-se que a presença de alterações cromossômicas não interfira no processo meiótico e, na maioria das vezes, é compatível com a oogênese, aumentando assim o risco de formar gametas aneuploides. No homem, geralmente essas alterações podem estar associadas à baixa concentração seminal e, conseqüentemente, à esterilidade.

A seguir, são apresentadas as principais alterações cromossômicas nos genitores que podem causar AR.

### *Mosaicismo cromossômico*

O mosaicismo de alteração cromossômica pode causar anomalias no desenvolvimento do indivíduo. Quanto maior for a proporção da linhagem de células alteradas, mais afetado poderá ser o indivíduo.

O mosaicismo cromossômico baixo – menos de 10% das células alteradas – é observado em casais com cariótipo normal, história de AR e/ou filhos com a mesma alteração cromossômica, por exemplo, trissomia do cromossomo 21 ou 18. Esta linhagem anormal pode ocorrer em 1 a 2% das células e passar despercebida em uma análise citogenética convencional, além de que este mosaico pode não estar presente nos linfócitos, mas somente no tecido gonadal ou vice-versa. Nestes casos onde há suspeita de mosaico cromossômico em um dos pais, mas o cariótipo é normal, o indicado em uma futura gestação é acompanhamento e DNP.

Normalmente, a monossomia de cromossomo sexual em mosaico é resultado da perda de um cromossomo instável, isto é, anel do X ou Y, dicêntrico X ou Y, e deleção com tendência a reunião das cromátides em seus pontos de quebra. Para os cromossomos autossomos não são encontrados mosaicismos porque sua monossomia é letal.

### *Translocações cromossômicas recíprocas*

Translocação recíproca é a troca de material genético entre dois cromossomos não homólogos, podendo ser balanceada ou desbalanceada. As translocações recíprocas, não robertsonianas, devido ao número e à variedade já vistos, representam os mais frequentes tipos de alterações cromossômicas no homem. A frequência de translocações balanceadas na população em geral é estimada em 0,17%. Em casais com dificuldades de gestação esta percentagem é mais alta.

A maioria das perdas espontâneas ocorre devido à translocação balanceada em um dos genitores, que pode causar alterações nos cromossomos dos gametas e, conseqüentemente, nos seus embriões. Gametas malformados muitas vezes ocasionam infertilidade, abortos de repetição e nascimento de crianças com malformações. Em casais portadores destas alterações, os produtos de uma concepção podem apresentar cariótipo normal, a mesma alteração cromossômica balanceada do progenitor portador ou, ainda, uma alteração cromossômica desbalanceada.

Em alguns casos raros, a translocação recíproca envolve mais de dois cromossomos, o que dificulta a formação de gametas cromossomicamente normais. Nestes casos, a utilização de gametas doados pode ser uma solução para o casal.

O diagnóstico da translocação recíproca em pacientes inférteis é bastante importante quando o casal deseja filhos. Com o auxílio da reprodução assistida, é possível selecionar embriões cromossomicamente normais a partir da técnica de diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, de *preimplantation genetic diagnosis*).

### *Translocações robertsonianas*

As translocações robertsonianas (TRs) são rearranjos estruturais que envolvem trocas completas entre os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, resultando na fusão de

dois cromossomos acrocêntricos através do centrômero. Elas podem envolver os cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22.

Quanto à frequência, as TRs são alterações comuns em humanos, estando presentes em 1/1.000 RNs, 1/900 amniocenteses de segundo trimestre, e correspondendo a 1% de todas as anormalidades cromossômicas.

As TRs são identificadas em 1,1% dos casais com abortos de repetição e 2 a 3% dos homens inférteis. A metade acontece *de novo*, sendo 98% originados na meiose materna, mas a ocorrência das TRs não tem associação com a idade materna. As TRs mais comuns são a rob(13q;14q) e a rob(14q;21q), que correspondem a 75 e 13% das TRs, respectivamente.

A meiose de um portador de uma TR balanceada pode produzir gametas normais, balanceados, nulissômicos ou dissômicos (ver Capítulo 8, Figura 8.21b). As concepções monossômicas são inviáveis e resultam em aborto precoce ou na perda de gestações pré-clínicas. As trissomias 14 e 15 e a maioria das trissomias 13, 21 e 22 também evoluem para aborto espontâneo. Assim, o principal risco

para a prole de um portador de TR é trissomia 21 ou 13 e dissomias uniparentais 14 ou 15.<sup>4</sup>

A presença de uma TR não tem efeito sobre os outros cromossomos durante a divisão celular,<sup>5</sup> portanto, não modifica o risco de outras alterações cromossômicas. A **Tabela 31.3** resume os riscos para a prole de um portador de uma TR balanceada.

O PGD pode ser uma boa opção para os casais com TR, especialmente quando estão presentes problemas de fertilidade. Para os casais em que um dos dois apresenta uma TR, o PGD diminui o risco de aborto e permite o nascimento de um filho normal em tempo mais curto em relação a concepções espontâneas (12,9 meses x 3,5 anos). Entretanto, para casais jovens e férteis não se deve ignorar a chance de uma criança saudável por concepção espontânea.<sup>6</sup>

Polimorfismos e infertilidade

Polimorfismos cromossômicos são variações que ocorrem na população em geral, envolvendo regiões de heterocromatina pre-

**TABELA 31.3**  
Risco de um filho com aneuploidia ou dissomia uniparental quando um dos pais é portador de uma translocação cromossômica heteróloga

Translocação balanceada	Risco (%) de trissomia 13 ou 21		Risco (%) de dissomia uniparental 14 ou 15
	TR materna	TR paterna	
rob(13q;14q)	1	< 1	< 0,5
rob(13q;15q)	1	< 1	< 0,5
rob(13q;21q)	10-15	< 1	-
rob(13q;22q)	1	< 1	-
rob(14q;15q)	-	-	< 0,5 (pat) e 0,5 (mat)
rob(14q;21q)	1	< 1	< 0,5
rob(14q;22q)	1	-	< 0,5
rob(15q;21q)	10-15	< 1	< 0,5
rob(15q;22q)	-	-	< 0,5
rob(21q;22q)	10-15	< 1	-

Fonte: Adaptada de Gardner e Sutherland.<sup>7</sup>

sentes nos cromossomos 1, 9, 16 e Y e regiões organizadoras de nucléolo (NORs) nos cromossomos acrocêntricos. Estudos recentes observaram que estes polimorfismos, até então considerados variações normais, aparecem em frequências mais elevadas em grupos de casais inférteis.<sup>8,9</sup> Um dos trabalhos comparou casais inférteis com grupo controle de casais férteis, notando uma incidência significativamente maior de polimorfismos como 9qh+ em homens e mulheres inférteis, e Yqh+ nos homens inférteis.<sup>9</sup>

A inversão do cromossomo 9, assim como a heterocromatina bastante aumentada do 9 ou do Y, é fácil de ver observada em bandejamento GTG. Recomenda-se que somente polimorfismos extremamente significativos sejam mencionados no laudo, ou seja, quando a região for pelo menos o dobro da correspondente do outro homólogo. O cromossomo Y pode ser comparado com o 22, que possui tamanho semelhante. Ainda não se sabe de fato qual é a função da heterocromatina nos cromossomos, porém, sugere-se que estas variações não devam ser ignoradas tanto pelo citogeneticista quanto pelo médico que solicitou o exame.

### Falhas repetidas de implantação

As falhas de implantação após procedimentos de reprodução assistida têm sido associadas a aneuploidias no embrião. Estudos de citogenética molecular em gametas masculinos e femininos (corpúsculo polar) têm

mostrado que os casais com cariótipo normal que apresentaram falhas recorrentes de implantação apresentam uma maior frequência de aneuploidias tanto em óvulos quanto em espermatozoides.<sup>10</sup>

## Investigação citogenética na infertilidade primária e secundária

A investigação da infertilidade masculina e feminina é realizada preferencialmente por profissionais especializados em reprodução humana. As anormalidades genéticas, incluindo as alterações citogenéticas mencionadas anteriormente, contribuem com uma pequena parcela dos casos, mas a sua presença determina particularidades para o manejo terapêutico. Assim, as causas genéticas devem ser investigadas sempre que houver indicação. As principais indicações para estudo citogenético nos casos de infertilidade primária ou secundária são apresentadas na **Tabela 31.4**.

Existe uma discussão na literatura a respeito da indicação de cariotipagem para todos os casais que serão submetidos à ICSI, considerando que anormalidades cromossômicas são comuns na população em geral e mais frequentes em casais inférteis, e que os procedimentos de fertilização assistida impedem mecanismos naturais para evitar concepções cromossomicamente desbalanceadas.<sup>11</sup> Vários grupos têm encontrado frequências mais ele-

**TABELA 31.4**

Indicações para investigação citogenética em casais com infertilidade primária ou secundária

Indicações
Abortamentos recorrentes
Amenorreia primária
Anormalidades ovulatórias
História familiar de malformações, retardo mental ou cromossomopatia
História familiar de infertilidade
Infertilidade masculina sem causa aparente
Oligospermia/azoospermia
Presença de dismorfias ou malformações congênitas
Preparação para ICSI

vadas de anormalidades cromossômicas tanto em homens quanto em mulheres com infertilidade candidatas a procedimentos diversos de reprodução assistida.<sup>12</sup> Por outro lado, a frequência de anormalidade cromossômica não difere do esperado em mulheres com função ovariana normal. Nesse contexto, deve-se considerar o impacto de uma anormalidade cromossômica não diagnosticada no resultado dos tratamentos de fertilização, tanto em termos da diminuição do sucesso quanto em relação ao risco de uma anormalidade desbalanceada no concepto.

## Conclusão

As alterações cromossômicas têm uma importante contribuição nas anormalidades reprodutivas em humanos. O diagnóstico citogenético é essencial para o aconselhamento genético dos casais inférteis, sendo determinante para o manejo terapêutico. Os avanços nos estudos citogenéticos de gametas e embriões têm contribuído para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fertilidade humana.

## Referências

1. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet*. 2004 Jul 17-23;364(9430):273-83.
2. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, et al. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update*. 2003 Jul-Aug;9(4):319-30.
3. Lau NM, Huang JY, MacDonald S, Elizur S, Gidoni Y, Holzer H, et al. Feasibility of fertility preservation in young females with Turner syndrome. *Reprod Bioet almed Online*. 2009 Feb;18(2):290-5.
4. Firth HV, Hurst JA, Hall JG. Oxford desk reference: clinical genetics. New York: Oxford University Press; 2005.
5. Therman E, Susman M. Human chromosomes: structure, behavior and effects. New York: Springer-Verlag; 1993.
6. Keymolen K, Staessen C, Verpoest W, Michiels A, Bonduelle M, Haentjens P, et al. A proposal for reproductive counselling in carriers of Robertsonian translocations: 10 years of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2009 Sep;24(9):2365-71.
7. Gardner RJM, Sutherland GR, editors. Chromosomes abnormalities and genetic counseling. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2004. (Oxford Monographs on Medical Genetics; no. 31).
8. Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online*. 2005 Dec;11(6):726-32.
9. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):88-95.
10. Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, Wainer R, Bergere M, Albert M, et al. Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Nov-Dec;25(11-12):539-45.
11. Papanikolaou EG, Vernaev V, Kolibianakis E, Assche EV, Bonduelle M, Liebaers I, et al. Is chromosome analysis mandatory in the initial investigation of normovulatory women seeking infertility treatment? *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2899-903.
12. Riccaboni A, Lalatta F, Caliarì I, Bonetti S, Somigliana E, Ragni G. Genetic screening in 2,710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *Fertil Steril*. 2008 Apr;89(4):800-8.

## Leituras recomendadas

Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Siffroi JP. Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients. *Reprod Biomed Online*. 2008 Apr;16(4):514-22.

Goud TM, Mohammed Al Harassi S, Khalfan Al Salmani K, Mohammed Al Busaidy S, Rajab A. Cytogenetic studies in couples with recurrent miscarriage in the Sultanate of Oman. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):424-9.

Iyer P, Wani L, Joshi S, Lakshmi J, Dalvi R, Chavan D, et al. Cytogenetic investigations in couples with repeated miscarriages and malformed children: report of a novel insertion. *Reprod Biomed Online*. 2007 Mar;14(3):314-21.

Pontes MD. Abortamento. In: Halbe HW. Tratado de ginecologia. 3ª ed. São Paulo: Roca; 2000. p.1125-6.

Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2nd ed. Berlin: De Gruyter; 2001. p.10-3.



# Diagnóstico genético pré-implantação

## Introdução

O diagnóstico genético pré-implantação, ou do termo em inglês *preimplantation genetic diagnosis* (PGD), é uma forma precoce de diagnóstico pré-natal (DPN), onde embriões formados *in vitro* podem ser avaliados quanto a alterações genéticas predefinidas. O diagnóstico envolve a retirada de um ou mais núcleos de blastômeros, de células do trofoectoderma embrionário ou dos corpúsculos polares do gameta feminino para posterior análise com diferentes técnicas de biologia molecular.

Introduzido somente a partir da década de 1990, como técnica experimental,<sup>1</sup> o PGD apresenta-se atualmente como procedimento estabelecido dentre as técnicas da medicina reprodutiva. Esta alternativa precoce de DPN tornou-se possível a partir do desenvolvimento das técnicas de fertilização *in vitro* (FIV).

A partir de 1978, com o nascimento do primeiro bebê concebido com a utilização das técnicas de FIV,<sup>2</sup> tem-se visto uma grande expansão na aplicação e no desenvolvimento dessas técnicas. Atualmente, cerca de 1% de todos os nascimentos são concebidos com a utilização das práticas de FIV.

As técnicas de FIV introduzidas nos anos de 1970 não apenas revolucionaram o tratamento de pacientes inférteis como também proporcionaram o acesso à avaliação dos gametas femininos e embriões pré-implantação. A evolução da medicina genômica e os crescentes avanços nas áreas de diagnóstico genético possibilitaram a avaliação de alterações cromossômicas e genéticas constitucionais em células únicas.

## Obtenção de gametas e embriões

Para a realização do PGD, é necessária obrigatoriamente a utilização das técnicas de reprodução assistida com FIV. A FIV consiste em todas as técnicas de interação entre os gametas masculino e feminino realizadas com ambos no laboratório, objetivando a formação de zigotos e embriões.

As técnicas envolvem vários passos, sendo que os casais, ao se submeterem aos procedimentos, devem estar cientes da complexidade dos processos. A mulher inicia um tratamento com medicamentos para estimulação ovariana, sendo necessário o acompanhamento do recrutamento e crescimento dos folículos por ecografia transvaginal. O processo de estimulação ocorre na busca de um maior recrutamento folicular e consequente obtenção de um maior número de oócitos.

A obtenção de um grande número de oócitos pode proporcionar um maior número de embriões. A quantidade e a qualidade dos embriões podem ser determinantes para a realização do PGD. De acordo com o *guideline* ESHRE PGD Consortium,<sup>3</sup> é aceitável a exclusão de embriões de baixa qualidade do processo de biópsia e PGD. O reduzido aproveitamento da técnica e o baixo sucesso para embriões com atraso de desenvolvimento e de baixa qualidade já foram amplamente relatados, o que torna essencial o número de embriões com qualidade para a realização do PGD, sabendo-se que, de acordo com a alteração em questão, cerca de 50% dos embriões avaliados podem apresentar-se afetados.

Findado o crescimento folicular, os folículos são aspirados por uma punção por via transvaginal guiada por ultrassonografia, e os oócitos captados são separados do fluido folicular em ambiente laboratorial. Neste dia, uma amostra contendo espermatozoides é conjuntamente preparada no laboratório.

A formação do embrião começa com a fertilização; esta, por sua vez, dá o gatilho para o oócito completar o processo de meiose II (veja o Capítulo 3). Com a formação do zigoto, cerca de 18 a 22 horas após a fertilização ocorre a visualização dos pronúcleos masculino e feminino. Após a junção dos pronúcleos, o desenvolvimento do embrião ocorre através de um processo que engloba a reprogramação celular, uma série de clivagens sequenciais e a ativação do genoma embrionário. Uma série de divisões celulares segue até aproximadamente o quarto dia de desenvolvimento, quando o embrião começa o processo de compactação para formar a mórula e, em seguida, começam as primeiras diferenciações celulares com a formação de uma massa celular interna e uma camada externa formando o trofoectoderma do blastocisto.

No processo de FIV, o dia da punção folicular e fertilização é considerado “dia 0”. O dia seguinte, onde os pronúcleos podem ser visualizados, segue como “dia 1”, e no “dia 2” ocorrem as primeiras clivagens. No “dia 3” o embrião atinge o estágio de 6 a 8 células. No “dia 4” ocorre a compactação e a formação da mórula, podendo, então, ocorrer a formação de um blastocisto jovem a partir do “dia 5”. No “dia 6” o blastocisto encontra-se em processo de expansão – a manutenção a partir desta fase torna-se inviável pois começam os movimentos de contração e expansão findando na ruptura da zona pelúcida e extrusão do blastocisto para fixação na camada endometrial do útero materno.

Atualmente, dispomos basicamente de duas formas para a FIV: as técnicas de FIV convencional e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

A FIV convencional (**Quadro 32.1**) consiste na coleta e no preparo do sêmen, assim como na punção e separação dos oócitos, com a posterior junção dos gametas em uma mesma placa de cultivo celular. A interação entre os gametas ocorre em um ambiente com temperatura e umidade controladas, mas sem o auxílio de um operador. Cada oócito entrará em contato com cerca de 100 mil espermatozoides, entretanto, apenas um deve penetrar a zona pelúcida (ZP) por completo para uma fertilização correta (**Figura 32.1**).

A partir desta técnica, ocorre a dissociação da massa celular do complexo *cúmulus-oophorus*, a adesão e a ligação dos espermatozoides à ZP, a exocitose do acrossomo e a penetração de um espermatozoide (ou mais em caso de falha no bloqueio da ZP) no oócito. Por este processo, muitos espermatozoides, por mais que não tenham penetrado, permanecem aderidos à ZP.<sup>5</sup> Após a fertilização, a sequência de desenvolvimento celular segue com o cultivo *in vitro* dos embriões.

Em julho de 1992, Palermo e colaboradores<sup>6</sup> publicaram a primeira gestação e nascimento após a transferência de embriões gerados por uma nova técnica de FIV, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (**Quadro 32.2**). Na ICSI, um único espermatozoide é microinjetado em cada oócito, sendo depositado no citoplasma após a passagem pela ZP e ruptura da membrana oocitária (oolema) (**Figura 32.2**). A retirada das células do *cúmulus* ocorre pré-injeção intracitoplasmática, por ação da hialuronidase, sem a interação de diversos espermatozoides com o oócito.

#### QUADRO 32.1

##### Fertilização *in vitro* convencional

A FIV convencional é uma técnica amplamente utilizada, que se constitui basicamente na interação oócito-espermatozoide *in vitro* para fertilização. Quando a fertilização ocorre *in vitro* pelo método convencional, existe ainda uma seleção natural do espermatozoide, e mesmo que esta ocorra a partir de uma coorte selecionada de espermatozoides capacitados,<sup>4</sup> o processo não é operador-dependente.

QUADRO 32.2

Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

A sigla ICSI, amplamente utilizada, é derivada da denominação em inglês da técnica *intracytoplasmic sperm injection*, a qual se constitui basicamente da seleção e introdução de um espermatozoide (gameta masculino) em um oócito (gameta feminino) com o auxílio de um aparelho de redução de movimentos, um micromanipulador. Esta normalmente é a técnica eletiva para a formação de embriões para posterior avaliação genética. Por não entrar em contato com diversos espermatozoides, como na técnica de FIV convencional, a quantidade de material genético externo ao embrião fica bastante reduzida, diminuindo possíveis falhas e contaminações externas nos resultados.

A retirada das camadas celulares do cópulo juntamente com a ausência de espermatozoides aderidos à ZP minimiza a possibilidade de contaminação do DNA do blastômero com DNA de células externas, diminuindo assim erros de diagnóstico e avaliação dos embriões e tornando a técnica de ICSI o processo eletivo para posterior biópsia embrionária.

Embriões derivados de FIV convencional podem sofrer biópsia, entretanto, a ICSI é recomendada como a melhor prática pelo *Guidelines* de Thornhill e colaboradores<sup>3</sup> para os casos em que a análise do blastômero venha a ser realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Diversos estudos foram motivados pela ampla utilização da técnica de ICSI, buscando diagnosticar possíveis prejuízos na qualidade dos embriões derivados deste processo. Em estudo recente, Yoeli e colaboradores<sup>4</sup> obser-

varam que a qualidade do embrião não parece ser influenciada pela técnica de fertilização *in vitro* (FIV convencional ou ICSI), sugerindo que a qualidade depende de fatores intrínsecos dos gametas envolvidos.

O processo de cultivo e desenvolvimento embrionário segue da mesma maneira tanto para embriões derivados de FIV convencional quanto de ICSI, sendo diferenciado apenas pela técnica de fertilização aplicada.

Diagnóstico genético pré-implantação (PGD)

O PGD é realizado através da remoção e análise do material derivado de oócitos e/ou embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (**Quadro 32.3**). Este procedimento é utilizado para o diagnóstico genético de doen-

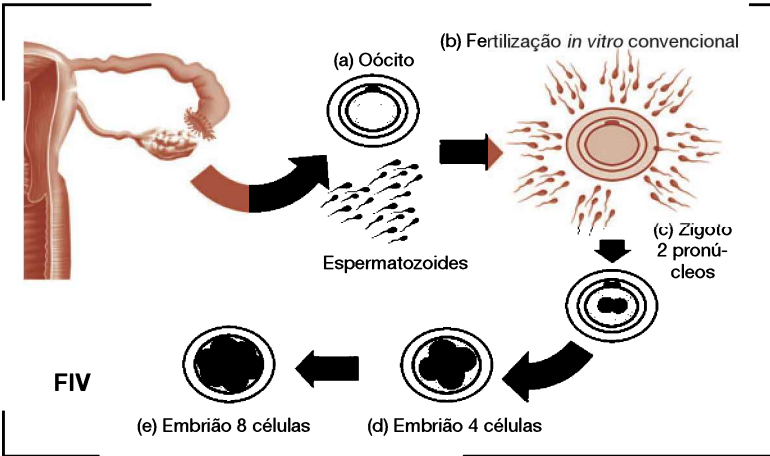
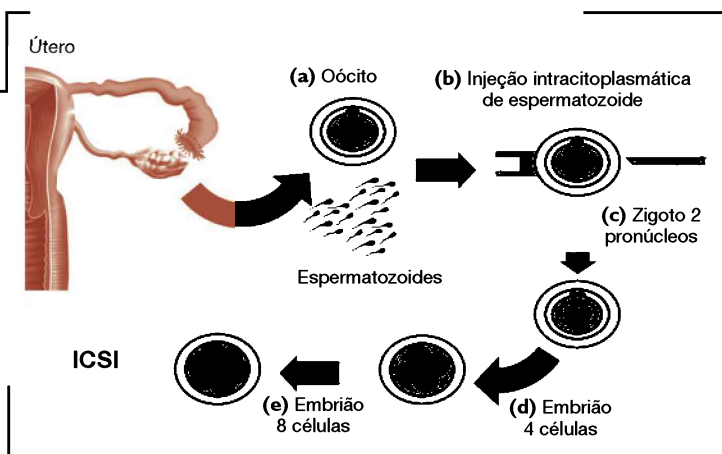


Figura 32.1

(a) Oócito em MII com visualização do primeiro corpúsculo polar. (b) Interação espermatozoides/oócito, objetivando a fertilização. (c) Visualização dos dois corpúsculos polares pós-fertilização e presença dos dois pronúcleos (♂ e ♀). (d) Embrião 4 células. (e) Embrião 8 células.

**Figura 32.2**

(a) Oócito em MII com visualização do primeiro corpúsculo polar. (b) Injeção intracitoplasmática do espermatozoide. (c) Visualização dos dois corpúsculos polares pós fertilização e presença dos dois pronúcleos (♂ e ♀). (d) Embrião 4 células. (e) Embrião 8 células.



ças monogênicas comuns ou raras com um padrão de herança simples e para o diagnóstico de aneuploidias ou alterações cromossômicas estruturais específicas. Atualmente, o PGD é utilizado para diagnosticar mais de 200 doenças diferentes, incluindo fibrose cística, Tay Sach's, hemofilias, doença de Huntington, síndrome do X frágil, entre outras, podendo também ser utilizado para determinação do HLA.<sup>7</sup>

As informações quanto a alterações genéticas derivadas de oócitos podem ser obtidas a partir de uma biópsia e avaliação dos corpúsculos polares.<sup>8</sup> Os embriões podem ser analisados a partir de um ou dois blastômeros retirados no terceiro dia pós-fertilização<sup>1</sup> ou através da análise de algumas células removidas do trofoectoderma do embrião em estágio de blastocisto.<sup>9,10</sup>

## Técnicas para retirada de corpúsculos polares, blastômeros e células do trofoectoderma

A biópsia para retirada do material pode ser realizada em três estágios de desenvolvimento pré-implantação:

1. Oócito: a biópsia do oócito para retirada dos corpúsculos polares é um método para a avaliação do gameta feminino pré e pós-fertilização. Envolve a retirada e a avaliação dos corpúsculos polares.

2. Embrião a oito células: a biópsia de embriões para retirada de blastômeros é um método para avaliação do embrião nos primeiros estágios de desenvolvimento, o qual envolve a retirada de um ou dois blastômeros. A biópsia é realizada no terceiro dia após a fertilização, quando o embrião encontra-se com 6 a 8 células, sendo o método mais utilizado para PGD.

3. Blastocisto: a biópsia de blastocisto para retirada de células do trofoectoderma é um método para avaliação do embrião em um estágio mais avançado de desenvolvimento. Envolve a retirada de células do trofoectoderma, podendo ser realizada no quinto ou sexto dia, permitindo a remoção de um maior número de células.

A abertura da ZP é uma etapa obrigatória para a realização da biópsia nos diferentes estágios de desenvolvimento. Diversas são as técnicas utilizadas para a abertura da ZP, e as três mais comumente aplicadas, de acordo com levantamento de dados existente na Europa desde 1999 (The European Society of Human Reproduction and Embryology ESHRE – ESHRE PGD Consortium data collection),<sup>11</sup> o qual inclui dados de diversos centros de reprodução assistida que realizam PGD, são: a abertura mecânica (dissecção parcial da zona), a abertura por *laser* e a abertura por agente químico (ácido Tyrode). De acordo com estudo de Balaban e colaboradores<sup>12</sup> as taxas de implantação e gestação são similares para todos os métodos citados.<sup>13</sup>



**QUADRO 32.3****Diagnóstico genético pré-implantação (PGD)**

PGD é outra sigla comumente utilizada para denominar a técnica, derivada da denominação em inglês *preimplantation genetic diagnosis*. É uma forma de DPN onde a avaliação ocorre antes mesmo da transferência dos embriões para o útero materno. A análise pode ser realizada no gameta feminino e no zigoto, avaliando-se o primeiro e o segundo corpúsculos polares no embrião a oito células – técnica mais comumente utilizada – ou em embriões em estágio de blastocisto.

A técnica de análise deve ser definida antes do procedimento, assim como as alterações genéticas a serem diagnosticadas, sendo necessário o conhecimento das alterações em questão e dos riscos de transmissão para prole.

**Ação mecânica**

A técnica de abertura por ação mecânica consiste na dissecação parcial tridimensional da ZP (**Quadro 32.4**).<sup>14</sup>

**Laser**

A abertura é realizada por um aparelho de *laser* de 1.480 nm de diodo sem contato e controlado por computador. Os aplicativos computadorizados possuem grande precisão no posicionamento, foco e alinhamento dos oócitos ou embriões para bombardeio com *laser*. O *laser* apresenta diferentes intensidades, sendo sua utilização padronizada de acordo com cada laboratório para cada tipo de rigidez da ZP (**Quadro 32.5**).

**QUADRO 32.4****Técnica**

- Posicionar o oócito ou embrião em uma placa sob um micromanipulador;
- Segurar pela pipeta *holding* posicionada em 9 h;
- Atravessar com uma micropipeta de vidro com ponta fechada em forma de agulha o espaço perivitelino tangenciando o material interno;
- Soltar da pipeta *holding* deixando-o fixo pela microagulha inserida;
- Friccionar a microagulha contra a *holding* até a ruptura da zona;
- Repetir a ação posicionando o oócito ou embrião de forma a realizar uma abertura em forma de X.

**Ação química (por ácido Tyrode)**

Técnica descrita por Cohen e colaboradores<sup>15</sup> é amplamente difundida e utilizada por diversos grupos na América Latina e Europa (**Quadro 32.6**).

**Biópsia para retirada dos corpúsculos polares**

A primeira divisão meiótica do oócito resulta na extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) contendo a contraparte de cromossomos presentes no oócito. A extrusão do segundo CP ocorre somente após a fertilização. A remoção do primeiro CP deve ser realizada após aproximadamente quatro horas da punção folicular, quando o CP está completamente destacado da membrana (oolema).<sup>8</sup> O modelo de avaliação do CP consiste em simplesmente fazer uma inferência sobre o genótipo do oócito, sendo este indiretamente derivado do oposto do material diagnosticado no primeiro CP. A análise do segundo CP pode ser realizada para aprimorar o diagnóstico e a avaliação do oócito. Esta

**QUADRO 32.5****Técnica**

- Posicionar o oócito ou embrião em uma placa sob um micromanipulador;
- Segurar pela pipeta *holding* posicionada em 9 h;
- Posicionar a marcação na região de interesse para abertura;
- Disparar os pulsos até a abertura do tamanho e forma desejada.

estratégia permite a identificação de alterações cromossômicas derivadas da segunda divisão meiótica, sendo essencial para doenças monogênicas buscando definir o *status* de oócito após possíveis recombinações e *crossing-over* posteriores à primeira divisão meiótica (**Quadro 32.7**).<sup>16,17</sup>

A técnica parece não interferir nos processos de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário, não sendo o material dos CPs parte integrante do processo de formação do embrião.

A biópsia de CP inicialmente apresentou-se vantajosa quando comparada à biópsia embrionária, pelo fato de não alterar a composição do conteúdo de formação embrionária e o material removido não estar destinado a tornar-se parte do embrião em desenvolvimento. Este procedimento elimina todo e qualquer debate ético e de segurança a respeito da manipulação genética em embriões humanos,<sup>17</sup> entretanto, apenas o material extrusado pelo oócito pode ser avaliado.

A análise de CP pode ser utilizada para detecção de alterações cromossômicas numéricas derivadas do gameta materno, visto que o avanço da idade materna está diretamente relacionado ao aumento das aneuploidias. Em alguns centros a biópsia de CP é então utilizada para pacientes com idade avançada, sendo considerado como um *screening* genético pré-implantacional materno, ou para análise

cromossômica de translocações derivadas da parte materna.<sup>19</sup>

A avaliação dos CPs possui vantagem em manter a integridade do embrião, entretanto, não pode ser utilizada para detecção de alterações paternas e alterações originadas após a fertilização ou nas primeiras clivagens. Esta não é a prática preferencial da maioria dos centros que dispõem das diferentes técnicas, de acordo com levantamento.<sup>13</sup>

#### QUADRO 32.6

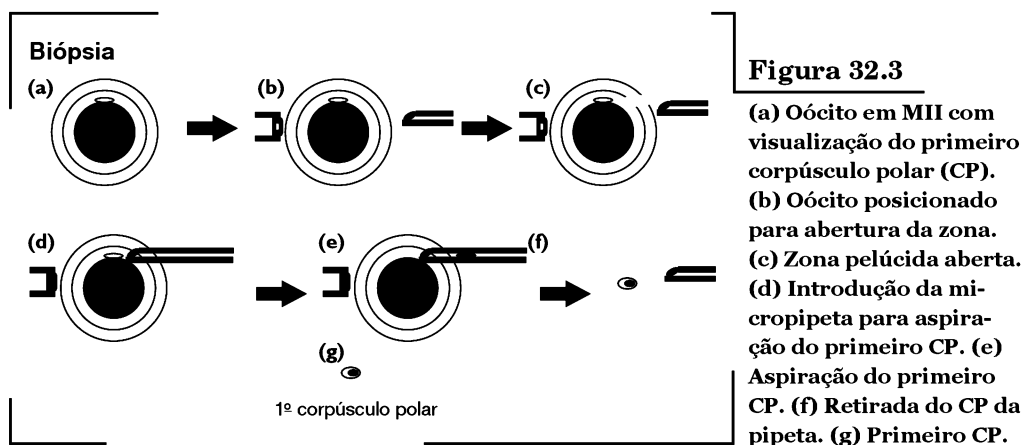
##### Técnica

- Posicionar o embrião em uma placa sob um micromanipulador;
- Segurar pela pipeta *holding* posicionada em 9 h;
- Posicionar em 3 h uma micropipeta com 10 µm de diâmetro contendo ácido Tyrode;
- Aproximar da ZP a micropipeta contendo ácido;
- Liberar o ácido até a degradação e abertura de um espaço de cerca de 30 µm na zona;
- Lavar de forma abundante o embrião para retirada completa do ácido.

#### QUADRO 32.7

##### Técnica

- Posicionar o oócito em uma placa de Petri sobre equipamento para micromanipulação (Figura 32.3);
- Segurar o oócito com a pipeta *holding* posicionando o CP em 12 h (Figura 32.3);
- Pode-se fazer a abertura da ZP provocando um pequeno corte, por ação mecânica ou por *laser*; a abertura por ação química não é recomendada nesta etapa, podendo danificar de alguma forma a formação do eixo do fuso;<sup>18</sup>
- Introduzir uma micropipeta de vidro acoplado ao micromanipulador para aspiração do primeiro CP (Figura 32.3);
- Aspirar o primeiro CP, retirando para fora da ZP (Figura 32.3);
- Injetar um espermatozoide, pela técnica de ICSI, minimizando a manipulação do oócito, promovendo a inseminação no mesmo momento da aspiração (Figura 32.4);
- A aspiração do segundo CP pode ser realizada de 18 a 22 horas pós-fertilização, pela mesma abertura da aspiração do primeiro CP (Figura 32.4);
- Realizar a aspiração e a retirada do segundo CP com cautela, pois as junções ao oolema ainda podem estar presentes após a extrusão;
- A retirada de ambos os corpúsculos pode ocorrer simultaneamente após 18 a 22 horas de fertilização, reduzindo assim o tempo de exposição e o estresse da manipulação do oócito e zigoto, limitando a análise genética apenas dos zigos fertilizados corretamente. Entretanto, eventualmente no momento de avaliação da fertilização pode ter havido a degeneração do primeiro CP, não restando material para análise.<sup>16</sup>

**Figura 32.3**

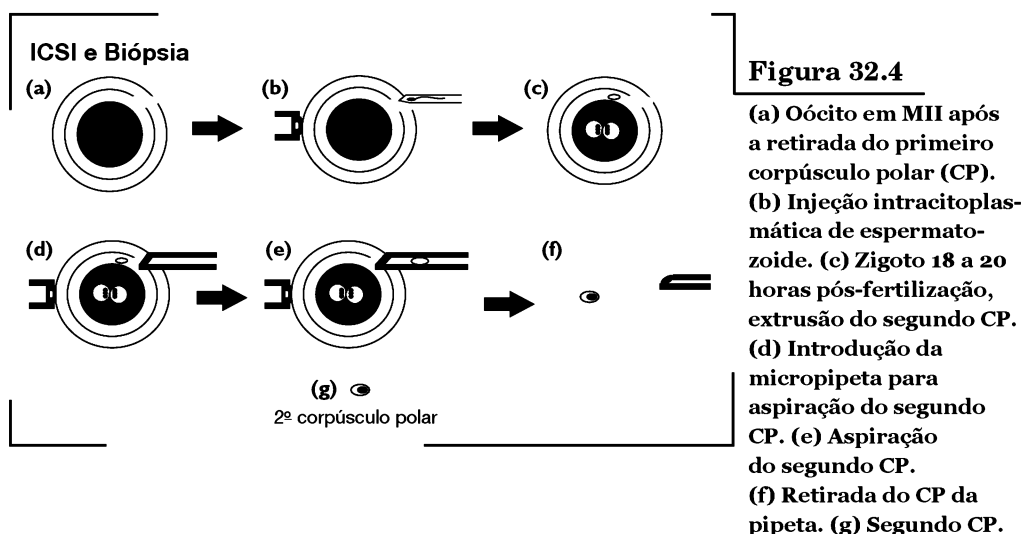
### Biópsia para retirada de blastômeros

Quando os embriões encontram-se com 6 a 8 células, um ou dois blastômeros são retirados e os embriões retornam ao cultivo para as clivagens subsequentes.<sup>20</sup>

A biópsia embrionária deve ser realizada no dia 3 pós-fertilização, preferencialmente no início da manhã do terceiro dia, mas somente quando o embrião apresentar no mínimo seis células, para não causar um considerável decréscimo no número de células para dar a sequência ao desenvolvimento (**Figura 32.5**).

Uma das vantagens da retirada do blastômero neste estágio está no tempo para avaliação – o embrião segue as etapas de clivagem, podendo ser transferido até o sexto dia de desenvolvimento. Os embriões biopsiados neste estágio não parecem apresentar efeitos adversos à retirada de células, seguindo o desenvolvimento até o estágio de blastocisto.<sup>21</sup>

A retirada de blastômeros neste estágio também apresenta algumas desvantagens, como a pequena quantidade de material a ser removida, assim como as células removidas estarem diretamente envolvidas no processo de formação do feto.

**Figura 32.4**

As junções entre as células tornam-se mais evidentes a partir desta etapa seguindo para compactação, sendo necessária a colocação dos embriões em um meio livre de cálcio e para uma dissociação temporária das *gap junctions* celulares, permitindo uma melhor remoção dos blastômeros.

Vários protocolos são aplicados para a retirada de células do trofoectoderma, mas atualmente a biópsia de blastômeros de embriões de oito células ainda é a prática mais comum.

## Biópsia de trofoectoderma

Uma das principais desvantagens da biópsia de um ou dois blastômeros de embriões a oito células está na quantidade limitada de material disponível para análise. Esta situação fica mais clara em casos em que o diagnóstico deve ser realizado a partir de protocolos com base na técnica de PCR (p. ex., para diagnóstico de doenças monogênicas), onde possíveis falhas na amplificação podem ocorrer, ou falha na amplificação de um alelo (alelo *dropout*), com ausência de resultado para alguns embriões, diminuindo assim a quantidade de embriões para transferência.

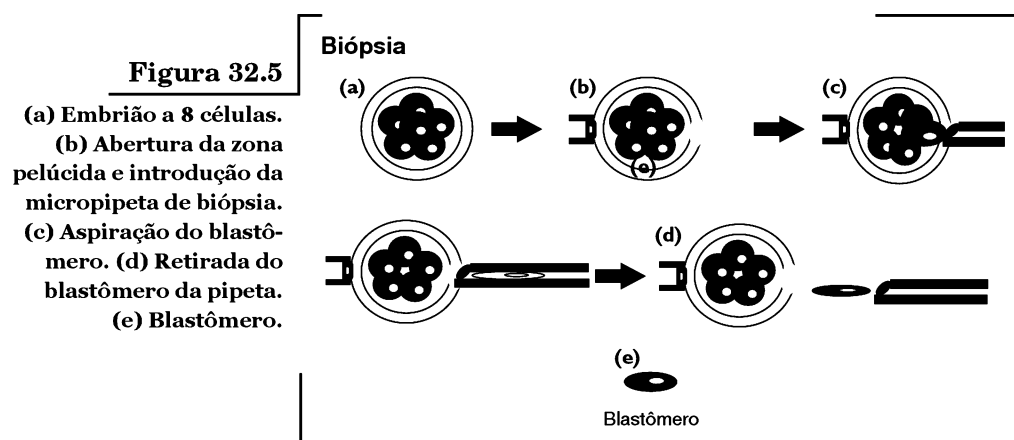
Uma das possibilidades para aumentar a sensibilidade da técnica e a taxa de obtenção de resultado está em aumentar a quantidade do material para análise. Com isso, surgiu a tentativa de biópsia de um maior número de células, como das células do trofoectoderma do embrião em estágio de blastocisto. Dorkas

e colaboradores<sup>22</sup> reportaram pela primeira vez os métodos de micromanipulação para biópsia e retirada de células do trofoectoderma de blastocisto, mesmo não sendo para aplicação clínica.

Blastocistos apresentam com maior frequência cariótipos normais quando comparados a embriões em estágios precoces de clivagem.<sup>23</sup> As células do trofoectoderma podem ser facilmente retiradas, e várias células podem ser removidas, minimizando as chances de ausência e erros de diagnóstico. Os embriões devem necessariamente chegar ao estágio de blastocisto para retirada de células do trofoectoderma – com isso, o bloqueio embrionário que ocorre a oito células já foi superado, servindo também como um processo seletivo. Entretanto, cerca de 10 a 20% apenas dos embriões chegam a blastocisto, limitando o número de embriões ao final do processo.<sup>21</sup>

As células embrionárias não podem ser retiradas após o 3º e até o 5º dia, pois se tornam mais próximas, formando uma massa compacta (mórula) que dificulta a biópsia. A biópsia de blastocisto deve ser realizada no 5º ou 6º dia pós-fertilização, quando o blastocisto possui cerca de 100 células, possibilitando a remoção de 5 a 10 células do trofoectoderma (**Figura 32.6**). Neste estágio, as células já possuem certo grau de diferenciação, sendo retirada uma pequena camada do trofoectoderma, mantendo intacta a massa destinada a desenvolver o feto.<sup>9,24</sup>

A biópsia de blastocistos ficou amplamente facilitada pela introdução da tecno-





logia a *laser* para ruptura da ZP. Alguns grupos utilizam protocolos onde primeiramente faz-se uma pequena abertura na ZP (dia 3 ou 4), dando sequência ao desenvolvimento embrionário, realizando a biópsia das células no estágio de blastocisto (dia 5 ou 6).<sup>25</sup> Recentemente foram publicados diversos relatos de gestações pós-biópsia embrionária e PGD de embriões em estágio de blastocisto.<sup>24,26</sup>

## Métodos de análise genética

### Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O PGD está indicado para casais que apresentam risco de transmissão de doenças genéticas específicas ou alterações cromossômicas para sua prole.

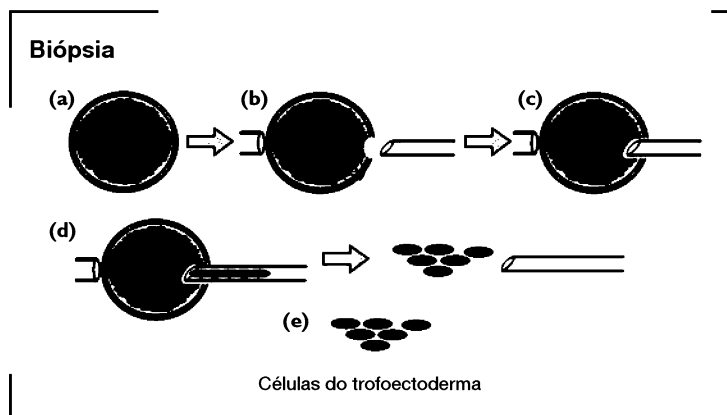
Para portadores de doenças autossômicas dominantes, o risco de transmissão da doença para qualquer embrião é de 50%; para portadores de doenças autossômicas recessivas, o risco de transmissão é de 25%. Para mulheres portadoras de doenças ligadas ao X, o risco de embriões masculinos serem afetados é de 25%.

Para identificação de mutações em genes específicos aplicam-se técnicas envolvendo a PCR, para amplificar o segmento genômico que contenha o gene de interesse. Muitas das doenças genéticas relevantes envolvem um defeito em um único gene ou mutação em um único par de bases.

Para detecção de doenças monogênicas pela técnica de PCR, são necessárias algumas etapas anteriores ao início do ciclo de desenvolvimento e análise dos embriões. A confirmação e a detecção das possíveis mutações apresentadas pela doença em questão no DNA do casal são os primeiros passos para o futuro diagnóstico nos embriões. Para o mapeamento, é necessária a identificação de marcadores proximamente ligados à região, devendo estar incluídos como controles na reação para o estudo do casal.<sup>27</sup> Assim como a identificação de controles, também é necessária a validação da técnica, utilizando testes em célula única derivada de outros tecidos (p. ex., células da camada bucal, linfócitos e possíveis blastômeros de embriões descartados). Os valores recomendados de eficiência da técnica são de amplificação não inferior a 90%.

A disponibilidade de reagentes livres de DNA e uma área equipada e específica para realização do exame são de grande importância para a eficácia da técnica, sendo estes os requisitos mínimos para avaliação.

A PCR é um meio de fornecer material suficiente para avaliação utilizando *primers* específicos das mutações, digestão com enzimas específicas, ou análise heteroduplex – técnica na qual fragmentos de DNA em estudo e uma amostra normal conhecida são hibridizados e subsequentemente são corridos em um gel de eletroforese. A falta de recombinação na presença da deleção ou até mesmo a troca ou substituição envolvendo um par de base resultarão em uma migração diferenciada no gel, o que permite o diagnóstico.



**Figura 32.6**

(a) Blastocisto. (b) Abertura da zona pe-lúcida. (c) Introdução da micropipeta de biópsia. (d) Aspiração das células do trofoectoderma. (e) Células do trofoectoderma.

Atualmente, o PGD é utilizado para diagnosticar mais de 200 doenças. A indicação mais comum de acordo com o último ESHRE PGD Consortium IX<sup>13</sup> para doenças autossômicas recessivas foi para  $\beta$ -talassemia, e para doenças autossômicas dominantes foi para distrofia muscular de Duchenne e doença de Huntington.

## Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

O diagnóstico por FISH pode ser utilizado para PGD na identificação das aneuploidias mais comuns e alterações estruturais específicas, podendo ser aplicado para avaliação de células únicas, em núcleos em interfase.

FISH é a técnica citogenética molecular que utiliza sondas, ou seja, sequências de DNA complementares ao que se pretende estudar. Sondas marcadas com fluorocromos possibilitam a detecção de uma região cromossômica específica tanto no cromossomo metafásico quanto interfásico. A técnica de FISH é utilizada para detectar a perda ou o ganho de determinado material cromossômico, assim como para detectar alterações estruturais não balanceadas decorrentes de rearranjos específicos derivados dos progenitores em oócitos e embriões.

## Alterações cromossômicas numéricas – aneuploidias

Atualmente, a determinação dos cromossomos sexuais é realizada pela técnica de FISH, na qual as sondas são formadas por sequências específicas da região centromérica dos cromossomos X e Y marcadas com fluorocromos. Associadas a elas, utilizam-se sondas, também marcadas, para regiões específicas de outros cromossomos autossômicos. Os sinais específicos para cada cromossomo podem ser visualizados nos núcleos das células em interfase.

A análise por FISH de múltiplos cromossomos necessita do uso simultâneo de múltiplas sondas de DNA marcadas com diferentes fluorocromos. A aplicação de *multicolor* FISH já foi realizada em diversos tipos de tecidos.<sup>28-30</sup> Atualmente, 3 a 12 pares de cromossomos podem ser avaliados em um mesmo blastômero. Para aumentar o número de cromossomos

avaliados, são necessários ciclos sucessivos de hibridização no mesmo blastômero; entretanto, a cada ciclo de hibridização a acurácia do teste diminui de maneira significativa.<sup>31</sup> Outra estratégia para ampliar a contagem cromossômica no mesmo núcleo deriva da combinação de dois ou mais fluorocromos, aumentando a avaliação para dez cromossomos em dois ciclos de hibridização.<sup>32</sup> Três cores de fluorocromos são utilizadas atualmente (vermelho, verde, azul), e a mistura em diferentes proporções destes fluorocromos promove um maior número de cores. A disponibilidade de um número maior de fluorocromos facilitaria o processo de avaliação simultânea de um maior número de cromossomos. De acordo com estudo de Bahçe e colaboradores,<sup>33</sup> as sondas para os cromossomos X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 22 podem ser utilizadas em duas etapas de hibridização, com um potencial para detecção de 70% das aneuploidias encontradas nos abortos espontâneos.<sup>34</sup> As sondas podem checar um número ainda restrito de cromossomos, sendo estes os mais frequentemente envolvidos nas aneuploidias observadas em material de aborto.

A partir da biópsia do blastômero, a célula passa por um processo de fixação e exposição do material nuclear. O blastômero passa para uma lâmina de vidro, onde o citoplasma é disperso tornando o núcleo exposto e fixado, e as sondas fluorescentes são colocadas para hibridizar com os cromossomos presentes no núcleo. O número de sinais fluorescentes referentes a cada cor em particular reflete o número de cópias de cada segmento de cromossomo presente na célula.

Hoje em dia, existem diversos protocolos para fixação do blastômero pós-biópsia. O método tradicional de fixação, desenvolvido primeiramente por Tarkowski e colaboradores<sup>35</sup> e modificado posteriormente de diversas maneiras por vários autores, utilizando solução de ácido acético/metanol (Carnoy), envolveu novamente adaptações e modificações para fixação dos blastômeros. Este método descrito por Tarkowski e colaboradores<sup>35</sup> e modificado para fixação de blastômeros por Munné e colaboradores<sup>36</sup> necessita de grande habilidade e prática do operador (**Quadro 32.8**). Por esta razão, diversos outros protocolos de fixação foram desenvolvidos. Dentre eles, temos um utilizando Tween 20 (T20) (**Quadro**

**QUADRO 32.8****Método 1: Tarkowski<sup>35</sup>  
modificado por Munné e colaboradores<sup>37</sup>**

- Sobre estereomicroscópio, expor o blastômero à solução hipotônica (0,075 mol/L KCL suplementado com 0,6% de albumina sérica bovina) por dois minutos;
- Colocar o blastômero sobre uma lâmina de microscópio em uma microgota de 1 a 2 µL com solução hipotônica;
- Colocar uma gota de fixador metanol/ácido acético (3:1) sobre o blastômero;
- O blastômero irá se deslocar sobre a lâmina após a primeira gota de fixador, sendo facilmente detectável neste momento, pois aparece de forma refringente antes de romper a membrana;
- Após a fixação, mas antes da ruptura da membrana, colocar uma segunda gota de solução hipotônica;
- Esperar a secagem da gota, e umidificar até a ruptura do citoplasma e a fixação do núcleo;
- Marcar a lâmina, com uma caneta de diamante, na posição aproximada do núcleo fixado.

**32.9)**<sup>38</sup> e outro utilizando uma combinação da solução de Carnoy e Tween 20 (**Quadro 32.10**).<sup>39</sup>

De acordo com estudo de Velilla e colaboradores,<sup>40</sup> o qual comparou os três métodos de fixação anteriormente descritos, a perda de material nuclear para as três técnicas foi similar, ficando entre 2,8 e 3,6%. A taxa de erro e sobreposições para os métodos avaliados foi de 10% para o método 1, sendo significativamente menor que a apresentada para o método 2, de 30%. O método 2 apresentou resultados de baixa qualidade, sendo o primeiro método ainda o de menores chances de erro, seguido do método 3, o qual apresentou qualidade razoável na fixação nuclear, sendo mais fácil de aplicar.

A fixação do blastômero é uma etapa essencial para o sucesso na realização da

FISH. De acordo com estudo de Munné e colaboradores,<sup>37</sup> os erros para o método quando aplicado em blastômeros são derivados de três fontes:

1. a fixação imprecisa do núcleo, ficando recoberto por citoplasma, ou muito condensado, onde neste caso os sinais de hibridização aparecem muito fracos, desfocados e ou pulverizados;
2. sobreposições de sinais, as quais produzem resultados falso-negativos. As sobreposições de sinais ocorrem mais frequentemente quando o diâmetro do núcleo fixado é muito pequeno; e
3. a divisão de sinais em duas marcações, os quais produzem falso-positivos, podendo ocorrer por falhas no processo de fixação nuclear, ficando o núcleo esticado e produ-

**QUADRO 32.9****Método 2: Coonen e colaboradores<sup>38</sup>**

- Sobre estereomicroscópio, expor o blastômero em solução hipotônica por 5 a 10 segundos (1% de citrato de sódio suplementado com 0,2 mg/mL de albumina sérica bovina);
- Transferi-lo para uma placa de Petri com solução de T20 por dois minutos;
- Colocar o blastômero sobre uma lâmina de microscópio em uma microgota de 3 µL de solução de T20;
- Sob observação, colocar a solução de T20 continuamente na gota até a ruptura da membrana celular;
- Marcar a lâmina, com uma caneta de diamante, na posição aproximada do núcleo fixado;
- Após a ruptura da membrana e da gota seca (material fixado), passar a lâmina por tratamento com pepsina 1% para digestão do citoplasma remanescente.

zindo uma impressão de sinais duplicados. O estágio celular do material nuclear pode produzir duas marcações indicando as duas cromátides-irmãs separadas. Outra causa está relacionada à divisão da própria sonda, sendo que algumas se dividem com maior frequência que outras, como as de marcação para os cromossomos Y e 18.

Após a fixação e identificação de cada blastômero, a técnica de hibridização deve seguir os passos de acordo com as sondas a serem utilizadas. Basicamente, a lâmina com o núcleo passa por um processo de desidratação, com banhos de dois minutos em uma sequência de etanol a 70, 85 e 95%. Terminada a etapa de desidratação, o conjunto de sondas é colocado sobre o núcleo, sendo recoberto por uma lamínula, que a seguir é selada. A lâmina é então colocada em uma placa para aquecimento, permanecendo três minutos a 78°C, passando para uma câmara úmida escura a 37°C durante 3 a 4 horas para o processo de hibridização. Terminado o tempo, a lamínula é retirada, e a lâmina é lavada por duas vezes em solução de citrato salina (SSC) durante cinco minutos a 72°C. A lâmina é, por fim, montada com 10 µL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e recoberta com uma nova lamínula. A visualização dos sinais para cada par de cromossomos deve ser realizada em um microscópio de fluorescência com os filtros adequados aos fluorocromos utilizados para marcação das sondas, e a análise deve ser realizada alguns minutos após o término do preparo da lâmina, objetivando uma rápida liberação do resultado, possibilitando uma nova hibridização, caso necessário.

Diversos são os protocolos para realização da FISH em blastômeros, variando de acordo

com o grupo de pesquisa, assim como com o número, o fabricante e o *pull* de sondas a serem aplicadas.

Os conjuntos utilizados para detecção de aneuploidias são compostos basicamente por dois tipos de sondas: sondas constituídas por uma sequência *locus-específica* (LSI, de *unique sequence locus-specific identifier probes*) e sondas centroméricas (CEP, de *centromere enumeration probes*). Os tipos de sondas utilizados na FISH estão explicados no capítulo 28.

### *Critérios para avaliação de blastômeros por FISH baseados nos critérios de Munné e colaboradores<sup>41</sup>*

- Blastômeros com dois sinais para cromossomos sexuais e dois sinais para cada cromossomo autossômico avaliado são considerados diploides.
- Blastômeros com um sinal para cada cromossomo analisado são considerados haploides.
- Blastômeros com três ou mais sinais para cada cromossomo analisado são considerados poliploides.
- Embriões com as mesmas alterações em todos os blastômeros são considerados aneuploides, haploides ou poliploides, dependendo da alteração.
- Em caso de blastômeros com um sinal extra ou a perda de um sinal, quando avaliados outros blastômeros do mesmo embrião e constatado um sinal extra ou a perda de

#### QUADRO 32.10

##### **Método 3: Dozortsev e McGinnis<sup>39</sup>**

- Sobre estereomicroscópio, expor o blastômero em solução hipotônica por 5 a 10 segundos (1% de citrato de sódio suplementado com 0,2 mg/mL de albumina sérica bovina);
- Lavar em solução de T20 (1% de T20 em 0,01 N HCL) por 40 segundos;
- Colocar o blastômero em uma microgota de 3 a 4 µL de solução de T20 em uma lâmina de microscópio sob estereomicroscópio e deixar secar completamente;
- Remover o citoplasma com várias gotas de fixador metanol:ácido acético (3:1) até a completa remoção e fixação;
- Marcar a lâmina, com uma caneta de diamante, na posição aproximada do núcleo fixado.

forma complementar ao outro blastômero, pode-se considerar que o mosaicismo foi gerado a partir de uma não disjunção mitótica;

- Em caso de blastômeros com perda de sinais de forma desigual e complementar a outros blastômeros do mesmo embrião, pode-se considerar que o mosaicismo embrionário resultou da clivagem desigual de um blastômero sem síntese prévia de DNA.

Exemplos: Blastômeros do mesmo embrião:

blastômero 1: X X; 18 18; 21 21.

blastômero 2: X \_; 18 \_; \_ \_.

blastômero 3: X \_; 18 \_; 21 21.

- Os mesmos critérios de 1 a 6 seguem para embriões multinucleados.
- Blastômeros com sinais extras ou perdas podem ser considerados erros por falso-positivo ou falso-negativo exceto se não contemplarem um dos critérios prévios.

As taxas de erro para a técnica de FISH já foram amplamente avaliadas em estudos prévios, de acordo com estudo de Munné e colaboradores.<sup>42</sup> Utilizando as sondas para os cromossomos X, Y, 13, 18/21, a taxa de erro foi de 7%; para os cromossomos X, Y, 13, 18 e 21, foi de 13%;<sup>43</sup> para X, Y, 13, 16, 18 e 21, foi de 9%,<sup>36</sup> e para X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 22, foi de 15%.<sup>36</sup>

Atualmente, os estudos buscando alterações numéricas em embriões são considerados estudos de rastreamento genético pré-implantação ou *screening* genético pré-implantação (ver tópico PGS, adiante).

## Alterações cromossômicas estruturais

Em diversos centros, os portadores de rearranjos cromossômicos como translocações recíprocas e robertsoniana, ou até mesmo com inversões, constituem um dos grandes grupos de interesse para técnica de PGD por FISH. Portadores de alterações cromossômi-

cas frequentemente apresentam uma alta taxa de abortamentos, muitas vezes uma diminuição da fertilidade, ou prole com rearranjos não balanceados derivados de suas alterações (ver Capítulo 8).

A utilização da combinação de sondas subteloméricas e centroméricas específicas aparece atualmente como uma estratégia para a determinação de embriões não balanceados. Entretanto, a diferenciação entre embriões normais e balanceados não é possível a partir deste protocolo, sendo as marcações idênticas para as duas formas.

Rearranjos cromossômicos complexos são rearranjos estruturais que envolvem mais de dois pontos de quebra. Os mais comuns envolvem três cromossomos e três pontos de quebra. Teoricamente, o potencial de desequilíbrio de cromossomos nos gametas de portadores de rearranjos complexos é superior às translocações simples, possuindo assim um risco ainda maior de aborto espontâneo recorrente. A aplicação do PGD em portadores de translocações cromossômicas vem demonstrando uma diminuição significativa nas taxas de abortamentos para este grupo de pacientes, sendo indicado também para portadores de rearranjos complexos.

A técnica é basicamente a mesma aplicada para avaliação de aneuploidias, entretanto, neste caso, busca-se avaliar os cromossomos envolvidos nas translocações em questão. O conjunto de sondas a ser utilizado deve ser testado em outros tecidos, de forma a definir a taxa de erro para avaliação em células únicas.

Escudero e colaboradores<sup>44</sup> demonstram, em estudo recente, uma taxa de embriões normais ou balanceados de 6,4% após análise com FISH para rearranjos específicos. Neste estudo, obtiveram uma taxa de implantação de 50% (seis embriões transferidos em quatro casais) e gestação por punção folicular de 40%, resultando em dois gêmeos dizigóticos com cariótipo normal, e uma gestação única com cariótipo balanceado, apresentando um resultado favorável para este grupo de pacientes com história prévia de abortos espontâneos, prole desequilibrada e baixa fertilidade.

## Hibridização genômica comparativa (CGH)

Em 1996, Wells e Delhanty aplicaram pela primeira vez em blastômeros um método de citogenética molecular que permite a avaliação simultânea do conjunto completo de cromossomos por co-hibridização de DNA, sendo adaptado para avaliação em célula única. Com a otimização da técnica, diversos grupos passaram a aplicá-la para avaliação pré-implantação em oócitos e embriões.<sup>45-48</sup> Este método, baseado na hibridização genômica comparativa (CGH, de *comparative genomic hybridization*), foi desenvolvido originalmente para avaliação de perdas e ganhos de material cromossômico em células tumorais.<sup>49</sup>

A técnica tem como base uma hibridização competitiva de amostras de DNA diferencialmente marcadas (DNA da amostra: verde; DNA de referência cromossomicamente normal: vermelho) a cromossomos normais em metáfase fixados em uma lâmina de microscópio. Fragmentos de referência (vermelho) e da amostra (verde) têm o DNA anelado às suas sequências complementares sobre os cromossomos, de modo que cada cromossomo torna-se revestido com milhares de fragmentos de DNA verde e vermelho. A proporção de fluorescência verde:vermelha ao longo do comprimento de cada cromossomo revela o número relativo de cópias do cromossomo da amostra em comparação com a referência.<sup>49</sup> Um excesso de fluorescência verde em um cromossomo específico é um indicativo de um ganho cromossômico, enquanto que um excesso de fluorescência vermelha é um indicativo de perda cromossômica (ver Capítulo 29). Este método elimina a necessidade de fixação dos núcleos dos blastômeros em lâminas, o que exige habilidade técnica e, em algumas situações, pode acarretar em perda do material nuclear, formação de sobreposições, entre outros.<sup>50</sup>

A CGH necessita de aproximadamente 1 µg de DNA para execução; entretanto, a quantidade de material obtida a partir de uma célula única chega a apenas cerca de 5 a 10 pg, sendo necessária a amplificação do DNA antes do início da técnica. Embora muitos métodos sejam

aplicados para amplificação, o mais amplamente utilizado baseia-se na anelação de *primers* semidegenerados seguida da técnica de PCR, conhecida como uma reação de PCR com oligonucleotídeos degenerados (DOP-PCR).<sup>46,51</sup> Diversos estudos têm apontado para as técnicas de amplificação total do genoma (WGA, de *whole genome amplification*) como um método revolucionário no PGD.<sup>52</sup>

Algumas alterações não detectáveis pela técnica de FISH podem ser avaliadas pela CGH, como pontos de quebras cromossômicas.<sup>45,47</sup> De acordo com os dados obtidos pela avaliação de diversos embriões pela técnica de CGH, aparentemente nem todos os cromossomos possuem o mesmo risco de aneuploidia. Os painéis de análise por FISH têm como tendência o rastreamento dos cromossomos que frequentemente apresentam-se aneuploides em amostras de pré-natal e em material de aborto. A partir dos resultados com CGH notou-se que não necessariamente somente estes cromossomos sejam importantes em relação às aneuploidias para embriões pré-implantação.

Dados com base em estudos com aplicação de CGH em blastômeros vêm demonstrando que cerca de 20 a 40% dos embriões que apresentam alterações cromossômicas não são detectados pela técnica de FISH com a aplicação dos *kits* comercialmente disponíveis.<sup>45,47,53</sup> Este fato demonstra que os atuais protocolos de FISH para rastreamento ainda não apresentam uma alta taxa de sucesso para a detecção das alterações e ainda não têm amplo sucesso em impedir a transferência de embriões aneuploides, o que reduz potencialmente a eficácia do método para a avaliação do embrião. Da mesma maneira, o método de CGH apresenta a desvantagem da impossibilidade de detecção de alterações envolvendo euploidias, como a não detecção de embriões haploides, triploides ou poliploides.

Recentemente, um novo painel de sondas de FISH foi introduzido para a seleção de embriões, com base em dez cromossomos selecionados a partir dos mais frequentemente alterados em CGH. Estima-se que esta estratégia venha a permitir uma detecção de cerca de 85% dos embriões aneuploides.<sup>54</sup> Embora seja possível obter altas taxas de detecção

para os embriões aneuploides sem rastrear todos os cromossomos, é sabido que o máximo de previsão só será alcançado com a avaliação de todos os cromossomos. Por esta razão, a aplicação de CGH para a triagem dos oócitos e embriões é uma possibilidade atraente. Atualmente, a CGH apresenta algumas dificuldades para sua aplicação, como a alta complexidade da técnica e os custos ainda elevados, assim como o tempo necessário para a realização, de aproximadamente quatro dias, que é incompatível com o tempo disponível para o PGD sem a criopreservação dos embriões.

Alguns estudos com a aplicação clínica de um protocolo de CGH no rastreamento de aneuploidias derivadas de oócitos já foram realizados. Essa estratégia permite a avaliação do primeiro corpúsculo polar biopsiado no dia da fecundação (dia 0) e a obtenção dos resultados até o 6º dia pós-fecundação, sendo compatível com a transferência de embriões frescos.<sup>55</sup> No entanto, aneuploidias decorrentes da meiose II, bem como as de origem paterna, não podem ser detectadas a partir desta abordagem.

Recentemente, algumas gestações foram obtidas com aplicação da CGH para rastreamento de aneuploidias derivadas dos oócitos, combinada com o diagnóstico de doenças monogênicas. Para este fim, foi realizada a análise do primeiro corpúsculo polar usando CGH e a retirada de um único blastômero biopsiado no 3º dia para análise de doenças monogênicas específicas.<sup>56</sup>

Uma solução para avaliação com o método de CGH, tanto de corpúsculo polar quanto de blastômeros biopsiados no 3º dia, está na criopreservação do embrião até a liberação dos resultados.<sup>45,53</sup> Neste caso, os embriões permanecem congelados enquanto a análise está sendo realizada; a partir dos resultados, os embriões normais são selecionados, descongelados e transferidos em um ciclo subsequente. A principal desvantagem deste procedimento está na redução no potencial de implantação embrionária causado pelo congelamento-descongelamento a partir das técnicas convencionais, e este problema parece ser agravado pela biópsia realizada no embrião.

No entanto, recentemente, com a introdução e o desenvolvimento da técnica de vitri-

ficação para oócitos e embriões, observou-se uma recuperação sem diminuição significativa nas taxas de sobrevivência dos gametas e embriões, ultrapassando, portanto, a principal barreira para aplicação clínica de CGH.

## Hibridização genômica comparativa usando *microarrays*

Atualmente, o método mais rápido para o rastreamento de alterações cromossômicas é a técnica de *microarray*. Da mesma maneira que os métodos de CGH convencionais, a maioria dos métodos de *microarray* envolve a hibridização competitiva entre as amostras de DNA a serem avaliadas com DNA de referência. No entanto, neste caso, as amostras são hibridizadas com sondas de DNA fixadas em uma lâmina de microscópio, em vez de cromossomos em metáfase. Cada sonda é específica para uma região cromossômica e ocupa um lugar distinto na lâmina. A perda ou o ganho de material cromossômico é determinado pela cor revelada por local após hibridização (pela razão de intensidade de fluorescência para as duas cores).

Uma das vantagens da técnica de *microarrays* para a CGH convencional está na facilidade e automação da avaliação dos índices de fluorescência, e o tempo de hibridização normalmente é menor.

O *microarray* tem sido aplicado com êxito para a detecção de aneuploidias em células isoladas, utilizando a amplificação total do genoma por DOP-PCR ou um método alternativo conhecido como amplificação por deslocamento múltiplo (MDA, de *multiple displacement amplification*).<sup>57,59</sup>

A aplicação do *microarray* permite uma avaliação global dos cromossomos em um prazo viável (~48 horas), possibilitando a transferência embrionária sem criopreservação. Futuramente, é bastante provável que o tempo de execução venha a ser reduzido, permitindo a avaliação dos embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento (blastocistos), quando o tempo disponível para avaliação é ainda menor.

O início de uma nova etapa no PGD está surgindo com o desenvolvimento e aprimoramento de diversos métodos que venham a



possibilitar a análise abrangente, simultânea e precisa de todos os cromossomos. Dentre eles, podemos notar a aplicação em estudos recentes de métodos como *microarray* CGH utilizando cromossomos artificiais de bactérias, biblioteca de cromossomos e sondas de oligonucleotídeos, todos possibilitando a detecção de aneuploidias em blastômeros. No entanto, são necessárias mais pesquisas para determinar se as taxas de precisão são mantidas em níveis aceitáveis quando o tempo de execução para a realização dos métodos é tão reduzido.

## Rastreamento genético pré-implantação ou *screening* genético pré-implantação (PGS)

Inicialmente, o desenvolvimento da técnica de PGD buscava basicamente a detecção de doenças genéticas.<sup>1</sup> Uma das motivações iniciais para a tentativa de diagnóstico antes mesmo da transferência embrionária para o útero surgiu da necessidade de aumentar as taxas de implantação e reduzir as perdas gestacionais.

As aneuploidias em gestações apresentam-se aumentadas com o avanço da idade materna e são as maiores causas de abortamentos,<sup>60</sup> sendo que 50 a 60% dos abortamentos esporádicos são derivados de alterações cromossômicas.<sup>61,62</sup>

A qualidade dos oócitos está diretamente relacionada às taxas de implantação, ocorrendo um decréscimo em ambos de acordo com o aumento da idade materna,<sup>63</sup> existindo uma correlação direta entre o aumento de aneuploidias encontradas em oócitos e embriões e declínio da implantação, com o avanço da idade materna. Em mulheres com idade superior a 37 anos, somente 35% dos embriões com mais de oito células no dia 3 são cromossomicamente normais, e 65% dos embriões chegam ao estágio de blastocistos expandidos.<sup>64</sup>

As taxas de aneuploidias crescem nos oócitos e nos embriões de acordo com o aumento da idade materna, mas também podem estar aumentadas em casais com cariótipo normal que apresentem perdas recorrentes precoces ou em casais com repetidas falhas de implantação.

O PGS para aneuploidias foi sugerido e publicado em 1993 por Munné e colaboradores,<sup>42</sup> utilizando blastômeros de embriões, e por Verlinsky e colaboradores<sup>65</sup> em 1995, em corpúsculos polares. A partir destas publicações, diversos grupos reportaram a utilização da técnica de análise de blastômeros com FISH para marcação dos cromossomos mais comumente envolvidos em aneuploidias, incluindo 13, 16, 18, 21, 22, X e Y. A técnica de PGS permite, atualmente, a avaliação numérica de alguns cromossomos constituintes de embriões em estágios iniciais de clivagem (**Quadro 32.11**). Teoricamente, a seleção de embriões euploides para transferência possibilitaria uma maior taxa de implantação e gestação e uma provável diminuição nas taxas de aborto.

Munné e colaboradores,<sup>42</sup> em 1993, publicaram o primeiro reporte de utilização de *screening* para aneuploidias realizado em célula única de embriões humanos, utilizando a técnica de FISH com múltiplas sondas (X, Y, 13, 18, 21). As indicações para *screening* genético são idade materna avançada, falhas repetidas de implantação, abortos de repetição e causas masculinas severas.<sup>66</sup>

O PGS surgiu como ferramenta para a detecção de embriões com maiores chances de implantação, auxiliando na seleção do melhor embrião para transferência, sendo uma informação extra aos critérios morfológicos aplicados. Na busca de melhorar o potencial e a integridade do embrião para a técnica de PGS otimizando as taxas de implantação, passou-se a retirar e avaliar apenas um blastômero por embrião.

Atualmente, poucos são os estudos randomizados e controlados realizados com.<sup>67</sup> O primeiro, publicado em 2004 por Staessens e colaboradores,<sup>61</sup> não demonstrou diferenças na taxa de nascimentos entre o grupo controle e o grupo com PGS em pacientes com idade materna avançada; entretanto, este estudo foi muito criticado pelo fato de realizar a biópsia em dois blastômeros de cada embrião. Vários estudos divergem em relação à alteração da viabilidade dos embriões pós-biópsia e retirada de um ou dois blastômeros. Harper, Repping e Hill<sup>67</sup> consideram que quanto maior o número de células removidas do embrião menor é o seu potencial de implantação.



## QUADRO 32.11

**Rastreamento genético pré-implantação ou *screening* genético pré-implantação (PGS)**

Assim como o PGD, o PGS é um tipo de diagnóstico pré-natal, onde a avaliação ocorre antes da transferência dos embriões para o útero materno. Neste tipo de avaliação não existe uma alteração cromossômica específica ou doença monogênica conhecida para análise do gameta ou embrião.

O PGS avalia, portanto, os cromossomos frequentemente envolvidos em alterações cromossômicas numéricas, como os cromossomos 13, 16, 18, 21, 22, X e Y. Estudos recentes apresentaram a possibilidade de avaliação de 12 cromossomos em um mesmo blastômero, melhorando a eficiência da técnica (cromossomos 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, X e Y).

Esta técnica é a mesma realizada para PGD por FISH, sendo direcionada principalmente para casais com necessidade de tratamentos de FIV com dificuldades em gestar após tentativas repetidas de FIV por falha de implantação, abortos de repetição, fatores masculinos severos ou idade materna avançada.

- A técnica tem por objetivo melhoria nas taxas de implantação, sendo utilizada para seleção de embriões com maiores chances de implantação.
- O PGS busca aumentar a taxa de gestação e implantação em pacientes inférteis ou subférteis.
- Apenas poucos cromossomos podem ser avaliados simultaneamente, e a análise dos 23 pares de cromossomos não é tecnicamente viável. O embrião avaliado pode ser considerado diploide apenas para os pares de cromossomos avaliados.

Um dos maiores problemas na detecção de aneuploidias por PGS não está somente caracterizado pelas falhas e limitações técnicas, mas principalmente por um fenômeno biológico: a alta taxa de mosaicismos presente em embriões em estágios iniciais de clivagem. Em determinados grupos de embriões, a taxa de mosaicismos pode chegar a 70%.<sup>47,68</sup> Alguns erros de diagnóstico já foram relatados: dois erros de diagnóstico em 334 fetos descritos na revisão de Munné<sup>37</sup> dois erros de diagnóstico em 91 fetos em um estudo de Gianaroli, Magli e Ferraretti<sup>69</sup> após PGD. Em todos os casos, após reanálise das células diagnosticadas com sondas de ligação para um *locus* específico diferente do anteriormente utilizado, foram confirmados os resultados anteriores, indicando que os erros provavelmente tenham sido derivados de mosaicismos presentes nos embriões. Estes dados estão de acordo com resultados obtidos por Munné,<sup>70</sup> onde 7,2% dos embriões não transferidos pós-PGD apresentaram erros de diagnóstico, sendo 60% deles causados por mosaicismos.

Uma das maiores críticas aos estudos de PGS está na apresentação apenas das taxas de implantação algumas vezes aumentadas, não levando em consideração as taxas de

gestação e nascimentos, muitas vezes similares aos grupos controles. Uma metanálise de cinco estudos<sup>64,71-74</sup> apresentou uma redução estatisticamente significativa na taxa de gestação em andamento após o PGS (gestação em andamento/ciclo): 13% (92 em 696) *versus* 21% (132 em 638) para grupo controle (odds 0,56, 95% CI 0,42-0,76). Muitos pontos ainda são discutidos em relação à utilização do PGS como prática de rotina para todos os casais, sendo questionada atualmente até mesmo para aqueles com indicação.

## Modificações e dificuldades das técnicas

Uma das maiores mudanças empregadas nas técnicas de avaliação dos blastômeros está relacionada ao tempo viável para execução do exame, pois o tempo entre a retirada do blastômero e a transferência do embrião para o útero é de 2 a 3 dias. Outra dificuldade está na quantidade de material disponível, o que pode variar de 1 a 2 blastômeros ou um pouco mais, caso o embrião biopsiado seja um blastocisto. Para a biópsia de blastocisto, o tempo viável para exame é muito curto, sendo quase sem-

pre necessária a criopreservação. Os resultados pós-descongelamento não são tão altos quanto transferência a fresco.

A combinação dos procedimentos de FIV e PGD promove uma taxa de embriões normais bastante reduzida para os testes avaliados. Sabendo-se que aproximadamente 70% dos oócitos fertilizam, cerca de 70% dos embriões chegam ao estágio de clivagem de 6 a 8 células e apenas 80% tornam-se apropriados para biópsia, considerando que cerca de 5% dos blastômeros não podem ser avaliados por ausência de material nuclear, temos algo em torno de 90% dos embriões com diagnóstico e cerca de 50% dos embriões possuindo a alteração testada; temos, em 100 oócitos puncionados, apenas cerca de 17 embriões para transferência.<sup>21</sup> Os dados a seguir relatam a casuística do último ESHRE Consortium 2009<sup>11</sup> reportando dados de 57 centros de dezembro de 2006 a outubro de 2007 (**Tabela 32.1**). De acordo com o último reporte, a utilização de PGD/PGS vem crescendo a cada ano.<sup>13</sup> Desde o primeiro reporte até o atual<sup>13</sup> foram relatados 21.743 ciclos de PGD/PGS com o nascimento de 3.841 bebês a partir destas técnicas.

Os estudos de acompanhamento das crianças nascidas a partir da utilização das técnicas de PGD e PGS não vêm demonstrando efeitos prejudiciais derivados da biópsia realizada, não existindo diferenças entre os grupos de pacientes derivados apenas das técnicas de ICSI e aqueles derivados de ICSI com biópsia para PGD/PGS. Verlinsky e colaboradores<sup>75</sup> reportaram um estudo de 754 bebês nascidos a partir de 4.748 ciclos de PGD sem aumento significativo na prevalência de malformações congênitas.<sup>75</sup>

## Perspectivas e limitações

Atualmente, os recursos da técnica de FISH são limitados, pois poucos cromossomos podem ser marcados e avaliados simultaneamente em uma célula única biopsiada.

Dentre as novas técnicas, a CGH convencional continua sendo o teste de escolha para triagem abrangente de aneuploidias. Novos estudos vêm buscando proporcionar a melhor combinação entre precisão, velocidade e custo, disponibilizando, em um futuro próximo, tecnologias a um custo-benefício e confiabili-

dade superiores aos apresentados neste momento.

Algumas colocações sobre riscos, custos e possíveis falhas biológicas ou técnicas devem necessariamente ser ponderadas com os casais que optam por realizar tanto o PGD quanto o PGS, sendo algumas delas:

- Obrigatoriamente são necessárias técnicas de reprodução assistida com FIV para a realização do processo, e o casal deve ser informado dos riscos associados a elas.
- Algumas falhas de clivagem são possíveis após a biópsia embrionária ou tão somente pela cultura extensa dos embriões mantidos *in vitro*.
- O risco de transmissão das doenças autossômicas recessivas ou ligadas ao X, podendo ser a prole portadora da doença em questão, deve ser considerado.
- Para portadores de translocações cromossômicas balanceadas ou outras alterações estruturais, deve-se revisar o modelo de segregação durante a meiose e vislumbrar a possibilidade de aumento do risco de alterações não balanceadas na prole, assim como a possibilidade de transmissão da forma balanceada da alteração, visto que não é possível diferenciar embriões normais de balanceados.
- Devem ser considerados: a possibilidade de erro de diagnóstico resultando em um falso-positivo, o que pode levar ao descarte de um embrião normal; um falso-negativo, com a transferência de um embrião alterado; a presença de embriões que apresentam mosaicismos com linhagens celulares normais e alteradas no mesmo embrião, dificultando ou até mesmo impossibilitando o diagnóstico; erros de divisões posteriores ao estágio de avaliação.
- Deve-se trabalhar com a possibilidade de ausência de embriões para transferência, sendo causada pelas falhas de clivagem ou de diagnóstico citadas anteriormente ou até mesmo pela presença de alterações em todos os embriões avaliados.

Portanto, existem limitações técnicas e possíveis falhas de diagnóstico no PGD e no PGS, apresentando-se assim a necessidade de DPN para confirmação de resultados por

**TABELA 32.1**  
Casuística do último ESHRE Consortium 2009: dados de 57 centros de fertilização assistida<sup>13</sup>

	Ciclos	Oócitos	Fertilizados	Biopsiados	Biopsiados com sucesso	Resultado	Embriões para transferência	Gestação com segmento/ciclo
Alterações cromossômicas	812	11.411	72% (7.056/9.794)	72% (5.062/7.056)	99% (5.015/5.062)	94% (4.725/5.015)	24% (1.126/4.725)	15% (126/812)
Doenças ligadas ao X	133	1.747	72% (1.141/1.574)	75% (851/1.141)	99% (844/851)	95% (800/844)	34% (275/800)*	18% (24/133)
Doenças monogênicas	931	12.402	75% (7.622/10.135)	70% (5.342/7.622)	99% (5.306/5.342)	89% (4.726/5.306)	45% (2.374/5.306)	23% (212/931)
PGS	3.900	42.763	71% (25.393/35.897)	80% (20.181/25.393)	99% (20.001/20.181)	93% (18.592/20.001)	36% (6.596/18.592)	16% (619/3.900)

\*Mulheres.

testes em vilosidade coriônica ou amniocentese. Uma alternativa, em alguns casos, está na utilização de células gaméticas doadas, o

que pode minimizar os riscos de transmissão de certas doenças para a prole em algumas situações.

## Referências

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990 Apr 19;344(6268):768-70.
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978 Aug 12;2(8085):366.
- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod*. 2005 Jan;20(1):35-48.
- Yoeli R, Orvieto R, Ashkenazi J, Shelef M, Ben-Rafael Z, Bar-Hava I. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Jan;25(1):23-8.
- Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):175-83.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul 4;340(8810):17-8.
- Ambartsumyan G, Clark AT. Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet*. 2008 Apr 15;17(R1):R10-5.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 1990 Oct;5(7):826-9.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril*. 2005 Dec;84(6):1628-36.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Gee AJ, De Boer KA, Jansen RP. Blastocyst trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenat Diagn*. 2008 May;28(5):434-42.
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). PGD consortium publications [Internet]. Belgium: ESHRE; c2010. Disponível em: [http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Specialty-Groups/SIG/Reproductive-](http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Specialty-Groups/SIG/Reproductive-Genetics/PGD-Consortium/PGD-Consortium-Publications/page.aspx/217)
- Genetics/PGD-Consortium/PGD-Consortium-Publications/page.aspx/217
- Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mucnu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod*. 2002 May;17(5):1239-43.
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod*. 2009 Aug;24(8):1786-810.
- Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril*. 1999 Feb;71(2):308-13.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod*. 1990 Jan;5(1):7-13.
- Gianaroli L. Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Hum Reprod*. 2000 Dec;15 Suppl 4:69-75.
- Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. *J Med Genet*. 2002 Jan;39(1):6-11.
- Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril*. 1989 Jan;51(1):139-48.
- Munné S, Scott R, Sable D, Cohen J. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil Steril*. 1998 Apr;69(4):675-81.
- Grifo JA. Preconception and preimplantation genetic diagnosis: polar body, blastomere, and trophoctoderm biopsy. In: Cohen J, Malter HE, Talansky BE, Grifo JA, editors. *Micromanipulation of gametes and embryos*. New York: Raven Press; 1992. p. 223-49.
- Findlay I. Pre-implantation genetic diagnosis. *Br Med Bull*. 2000;56(3):672-90.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod*. 1990 Oct;5(7):821-5.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to

- develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2001 Sep;16(9):1954-8.
24. de Boer KA, Catt JW, Jansen RP, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril.* 2004 Aug;82(2):295-8.
25. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, et al. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote.* 1997 Nov;5(4):351-4.
26. Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Jones GM, Cram DS, Stavrou D, et al. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major. *Hum Reprod.* 2005 Jul;20(7):1855-9.
27. Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T, Rechitsky M, Kouliev T, Strom C, et al. Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S65-8.
28. Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, et al. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry.* 1989 Jan;10(1):20-7.
29. Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ. Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet.* 1992 Nov;1(8):593-8.
30. Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet.* 1992 Aug;1(5):307-13.
31. Liu J, Tsai YL, Zheng XZ, Yazigi RA, Baramki TA, Compton G, et al. Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 1998 Oct;4(10):972-7.
32. Baart EB, Martini E, Van Opstal D. Screening for aneuploidies of ten different chromosomes in two rounds of FISH: a short and reliable protocol. *Prenat Diagn.* 2004 Dec 15;24(12):955-61.
33. Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munné S. Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Mol Hum Reprod.* 2000 Sep;6(9):849-54.
34. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation--a review. *Placenta.* 2003 Oct;24 Suppl B:S70-6.
35. Tarkowski AK. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics.* 1966; 5:394-400.
36. Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn.* 1998 Dec;18(13):1459-66.
37. Munné S, Márquez C, Magli C, Morton P, Morrison L. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod.* 1998 Sep;4(9):863-70.
38. Coonen E, Dumoulin JC, Ramaekers FC, Hopman AH. Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1994 Mar;9(3):533-7.
39. Dozortsev DI, McGinnis KT. An improved fixation technique for fluorescence in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2001 Jul;76(1):186-8.
40. Velilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online.* 2002 May-Jun;4(3):210-7.
41. Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier HU. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet.* 1994 Jul;55(1):150-9.
42. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 1993 Dec;8(12):2185-91.
43. Munné S, Weier HU. Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;75(4):263-70.
44. Escudero T, Estop A, Fischer J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet A.* 2008 Jul 1;146A(13):1662-9.
45. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet.* 2000 Feb;106(2):210-7.
46. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 1999 Feb 15;27(4):1214-8.
47. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 2000 Nov;6(11):1055-62.

48. Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 2004 Sep;19(9):2118-25.
49. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Ruto-vitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
50. Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res.* 2006;114(1):30-8.
51. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 1992 Jul;13(3):718-25.
52. Holbrook JF, Stabley D, Sol-Church K. Exploring Whole Genome Amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies. *J Biomol Tech.* 2005 Jun;16(2):125-33.
53. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril.* 2003 Oct;80(4):860-8.
54. Wells D, Alfara-wati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod.* 2008 Dec;14(12):703-10.
55. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril.* 2002 Sep;78(3):543-9.
56. Obradors A, Fernández E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, et al. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod.* 2008 Aug;23(8):1949-56.
57. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic. *Mol Hum Reprod.* 2004 Apr;10(4):283-9.
58. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Chu L, Weier U, Cohen J, et al. Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In: Papp Z, Rodeck C, editors. *Recent advances in prenatal genetic diagnosis.* Pianoro: Medimond; 2004. p. 9-17.
59. Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res.* 2006 May 12;34(9):e68.
60. Hassold TJ. Chromosome abnormalities in human reproduction. *Trends Genet.* 1986;2:105-10.
61. Boué J, Boué A, Lazar P. The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies. In: Blandau RJ, editors. *Aging gametes.* Basel: Karger; 1975. p. 330-48.
62. Stein Z. Early fetal loss. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1981;17(1):95-111.
63. Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Kars-taedt A, Scott RT Jr, et al. Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril.* 1994 Jan;61(1):97-101.
64. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2849-58.
65. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by FISH. *Hum Reprod.* 1995 Jul;10(7):1923-7.
66. Harper J, Sermon K, Geraedts J, Vesela K, Harton G, Thornhill A, et al. What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):478-80.
67. Harper JC, Repping S, Hill D. Current controversies in prenatal diagnosis 1: Is aneuploidy testing by PGD indicated for all infertile patients undergoing IVF? *Prenat Diagn.* 2009 Jan;29(1):2-5.
68. Munné S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod.* 1994 Sept 1;51(3):373-9.
69. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S13-8.
70. Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril.* 2002 Aug;78(2):234-6.
71. Stevens J, Wale P, Surrey S, Schoolcraft WB, Gardner DK. Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004;82(Suppl 2):249.
72. Debrock S, Melotte C, Vermeesch J, Spiessens C, Vanneste E, D'Hooghe TM. Preimplantation

- genetic screening (PGS) for aneuploidy in embryos after in vitro fertilization (IVF) does not improve reproductive outcome in women over 35: a prospective controlled randomized study. *Fertil Steril.* 2007;88:S237.
73. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007 Jul 5;357(1):9-17.
  74. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008 Dec;23(12):2806-12.
  75. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2004 Aug;82(2):302-3.

---

## Leituras recomendadas

- Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ. Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet.* 1992 Nov;1(8):593-8.
- Munné S, Dailey T, Finkelstein M, Weier HU. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Feb;13(2):149-56.
- Suzuki N, Yamada T, Matsuoka K, Hiraoka N, Iwamaru Y, Hata J. Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Placenta.* 1999 Mar-Apr;20(2-3):203-11.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod.* 2002 Nov;8(11):1035-41.
- Wells D, Delhanty J. Evaluating comparative genomic hybridisation (CGH) as a strategy for preimplantation diagnosis of unbalanced chromosome complements. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(Suppl 1):125.

Albert Schinzel

## Achados clínicos em pacientes com aberrações cromossômicas autossômicas

### Caracterização das aberrações cromossômicas autossômicas

As aberrações cromossômicas autossômicas são definidas pelos seguintes quatro critérios: retardo de crescimento intrauterino e pós-natal; um padrão de sinais de dismorfismo, especialmente de elementos da fâcies, genitália e segmento distal dos membros; malformações (geralmente múltiplas); desenvolvimento mental comprometido. Apesar de nenhum dos quatro critérios ser obrigatório, a deficiência mental é a característica mais consistente. Um padrão específico de dismorfismos é a característica mais útil para se estabelecer um diagnóstico clínico, quando confirmado com base em um número suficiente de casos.

### História familiar e gravidez

A grande maioria das aberrações cromossômicas não é hereditária. Os heredogramas de famílias que mostram rearranjos autossômicos hereditários geralmente indicam uma grande incidência de perdas fetais, fertilidade reduzida (principalmente em portadores masculinos) e neonatos com baixo peso ou prematuros com múltiplas malformações que vão a óbito logo após o nascimento. As seguintes complicações são mais frequentes em gesta-

ções com aberrações cromossômicas do que em outras gestações: sangramentos no primeiro e segundo trimestres; ameaças de aborto; poli-hidrânio ou, mais raramente, oligohidrânio; sinais de insuficiência placentária e retardo precoce do crescimento intrauterino.

O monitoramento cuidadoso com ecografia durante o segundo trimestre pode revelar anomalias como, por exemplo, crescimento intrauterino insuficiente, movimentos fetais anormais, anomalia na posição dos membros, inclusive mãos permanentemente fechadas e pés com deformidades, volume aumentado de fluido amniótico devido à atresia esofágica ou insuficiência cerebral grave, malformações cerebrais com hidrocefalia, defeitos do tubo neural, micro-oftalmia, fenda labial e fissura palatina, hérnia umbilical, hidronefrose, bexiga aumentada, além de muitas outras anomalias. Logo, um número crescente de anomalias cromossômicas é detectado na determinação pré-natal do cariótipo, sendo sugeridas por achados ecográficos anormais em mães jovens. Durante o período avançado da gravidez, o retardo do crescimento intrauterino e a insuficiência placentária frequentemente se tornam mais evidentes. A morte intrauterina na gravidez avançada é frequente em casos de trissomia 18,  $\text{del}(4)(\text{pter} \rightarrow \text{p}15)$  e aberrações cromossômicas com holoprosencefalia. O parto de fetos com aberrações cromossômicas tende a não acontecer na data estimada, o que pode levar a danos adicionais a um cérebro já estrutural e/ou funcionalmente afetado.



## Padrão de achados dismórficos

Em muitas das aberrações cromossômicas autossômicas mais conhecidas, um padrão específico de achados dismórficos é a característica mais consistente e o parâmetro mais útil no reconhecimento clínico de um caso isolado. Os traços dismórficos são considerados variações da forma e do tamanho normais e frequentemente não há um limite claro entre o que é dismórfico e o que é normal. Os distormorfismos, ao contrário das malformações, geralmente não afetam de modo adverso a função de um órgão, mas têm um efeito estético. Entretanto, às vezes é difícil separar um traço dismórfico de uma malformação: a úvula bífida pode ser definida como um traço dismórfico, enquanto a fenda palatina ou a fenda do palato mole são malformações.

Os traços dismórficos podem se apresentar em qualquer parte do corpo, mas os locais preferidos são o rosto, a genitália e o segmento distal dos membros. Alguns exemplos no rosto são: tamanho, forma e posição anormais das orelhas, fendas palpebrais oblíquas, hipertelorismo ocular, eixos oculares não alinhados, tamanho e forma incomuns do nariz e da mandíbula, configuração palatina incomum, entre outros. Os traços dismórficos podem simplesmente refletir um crescimento desproporcional durante o desenvolvimento fetal, e, nesse caso, frequentemente acontece um crescimento compensatório no final da infância ou na idade adulta. Dessa forma, os sujeitos adultos com frequência não apresentam os distormorfismos que tinham quando crianças. Logo, quando incidências de traços dismórficos são apresentadas em uma revisão de achados clínicos sobre uma aberração autossômica específica, a idade do paciente tem que ser levada em consideração. Os recém-nascidos e as crianças pequenas com síndrome do miado do gato [ $\text{del}(5)(\text{pter} \rightarrow \text{p}15)$ ] caracteristicamente apresentam “rosto com forma de lua”, mas quando adolescentes e adultos têm rosto estreito, longo e frequentemente assimétrico. Na síndrome de Down, as pregas epicânticas e a fenda palpebral oblíqua tendem a se tornar menos marcantes ou mesmo a desaparecer com a idade, enquanto a típica língua sulcada e os sulcos radiais nos lábios tendem a ficar

mais óbvios com o avanço da idade. A idade ideal para a avaliação de traços dismórficos é, geralmente, entre cerca de 3 a 4 semanas e 2 anos de idade, quando as deformações devido às restrições intrauterinas e à pressão durante o parto não estão mais presentes, e os distormorfismos mais salientes ainda não perderam intensidade. Por essa razão, sempre que possível, as ilustrações devem levar em consideração pacientes de várias idades e mostrar o mesmo paciente em diferentes idades.

Os traços dismórficos não devem ser considerados como achados isolados. Ao contrário, estão intimamente ligados uns aos outros. A hipoplasia da face média com ponte nasal baixa também leva a um nariz achatado, pregas epicânticas e impressão de hipertelorismo ocular aumentada. Os distormorfismos também podem refletir malformações de órgãos internos ou desenvolvimento fetal anormal, que não são visíveis com um simples exame clínico. Muitos traços são uma consequência direta de deficiências neurológicas durante a embriogênese ou da formação do feto, tais como, entre outros, orelhas salientes (insuficiência do músculo auricular posterior), crista palatina lateral saliente (falta de pressão da língua), ptose e estrabismo. As características faciais de holoprosencefalia refletem a malformação cerebral subjacente; o hipertelorismo e a inclinação mongoloide dos olhos são consequências de uma deficiência de estruturas do cérebro médio e da hipoplasia dos lobos frontais durante a embriogênese, e a sinostose craniana prematura é decorrente do fato de não haver pressão causada pelo cérebro em crescimento.

Um conjunto de distormorfismos é mais característico de uma aberração cromossômica autossômica do que um único sinal dismórfico. A falta de um ou mais traços nesse conjunto não afeta a impressão clínica geral. Assim, é o conjunto, e não o sinal individual, que frequentemente permite o reconhecimento clínico de um paciente com uma aberração autossômica ao primeiro olhar. O conjunto de distormorfismo de várias aberrações é muito marcante [p. ex., na trissomia 21,  $\text{del}(4)(\text{pter} \rightarrow \text{p}15)$ ,  $\text{dup}(9\text{p})$ ], enquanto é menos característico ou menos frequentemente reconhecido em algumas síndromes bem conhecidas, como na síndrome de  $\text{dup}(18\text{p})$ , em muitos casos de  $\text{trip}(22)(\text{pter} \rightarrow \text{q}11)$  e de  $\text{dup}(5\text{p})$ . A definição de um padrão clínico de distormorfismos encon-

trado em uma aberração cromossômica autossômica exige o conhecimento de pelo menos meia dúzia de pacientes em diferentes idades, o que poderá indicar quais sinais dismórficos são consistentes.

## Malformações congênicas

As malformações congênicas não causam necessariamente dano ao paciente. As que afetam o esqueleto e a pele são frequentemente de mera importância cosmética, tais como hexadactilia pós-axial, apêndices pré-auriculares e fistulas, enquanto as malformações dos olhos e órgãos internos, como cérebro, coração e rins, afetam a sobrevivência e as funções vitais. Distúrbios de desenvolvimento intrauterino localizados podem causar sinais dismórficos em uma ponta do espectro e malformações congênicas na outra. Como representam a ponta do espectro de maior gravidade e mais rara, as malformações congênicas geralmente são muito menos frequentes em uma aberração cromossômica específica do que um conjunto de traços dismórficos, tendo assim menos importância para o diagnóstico clínico. Com a exceção de malformações predominantemente herdadas devido à haploinsuficiência no caso de uma deleção, não há, até agora, praticamente nenhuma malformação que esteja invariavelmente relacionada a uma aberração cromossômica específica. Da mesma forma que no caso de traços dismórficos, uma combinação específica de várias malformações é mais característica do que

uma única alteração. Algumas combinações típicas são:

- malformações pré-auriculares, coloboma ocular, atresia anal, malformações renais e cardíacas na síndrome de olho de gato;
- fistula traqueoesofágica, aplasia radial, malformações cardíacas e má rotação intestinal na trissomia 18;
- aniridia, genitália masculina ambígua com hipospádia e tumor de Wilms em casos de del(11p13);
- atresia anal, coloboma ocular, defeitos cardíacos, falta do polegar, escroto bífido com hipoplasia peniana e holoprosencefalia em del(13)(q14→qter);
- hexadactilia pós-axial, fenda labial e palatina, micro-oftalmia, coloboma ocular e holoprosencefalia na trissomia 13.

As **Tabelas 33.1 e 33.2** apresentam malformações selecionadas que são comuns e incomuns, respectivamente, em aberrações cromossômicas autossômicas.

Há uma regra geral de que os pacientes com retardo do crescimento uterino mais grave também têm malformações mais frequentes e mais graves e, conseqüentemente, vão a óbito mais precocemente do que pacientes com as mesmas aberrações, mas com peso menos reduzido ao nascer.

As malformações dos órgãos internos geralmente incluem um espectro amplo, no qual um ou outro defeito pode ser especialmente

**TABELA 33.1**

Malformações comuns em aberrações cromossômicas autossômicas

### Malformações comuns

Malformações cerebrais, especialmente a holoprosencefalia e a agenesia do corpo caloso

Micro-oftalmia, coloboma ocular

Fenda palatal, fenda labial ou ambas

Espinha bífida (occipital ou lombar)

Malformação do coração e dos grandes vasos

Atresia esofágica ou duodenal, fistula TE, atresia anal com fistula

Má rotação intestinal, mesentério comum, hérnia umbilical

Malformação do rim e do trato urinário

Ausência ou hipoplasia radial e do polegar

Hexadactilia pós-axial

**TABELA 33.2**  
Malformações incomuns em aberrações cromossômicas autossômicas

Malformações comuns
Anencefalia, exencefalia, iniencefalia, otocefalia
Gastrosquise
Atresia do jejuno ou do íleo
<i>Situs inversus totalis</i>
Extrofia de bexiga ou cloaca
Ectromelia
Peromelia, amelia, focomelia, ectrodactilia
Artrogripose congênita
Defeito radial, fibulário ou ulnário
Teratoma
Gêmeos acardíacos ou outros gêmeos gravemente afetados
Gêmeos unidos

comum em uma aberração cromossômica. Por exemplo, na síndrome de Down quase metade dos pacientes tem malformação cardíaca; uma variedade de defeitos cardíacos ocorre, mas a comunicação atrioventricular é especialmente frequente se comparada com sua ocorrência em pacientes com cariótipos normais.

Na duplicação de comprimento diferente do mesmo braço do cromossomo, as malformações congênitas são mais frequentes e mais severas com o aumento do segmento duplicado, mas o padrão dismórfico se mantém bastante constante.

### Anomalias esqueléticas radiológicas

Anomalias radiológicas menos importantes do esqueleto são frequentes em aberrações cromossômicas autossômicas, mas muitas vezes são não específicas. Entre os achados mais frequentes estão: forma e número anormais de vértebras e costelas; formato anormal da pélvis; amadurecimento ósseo retardado, epífise cônica, pseudoepífise, e outras anomalias menores nos metacarpos, metatarsos e falanges. Há, entretanto, algumas aberrações com padrões mais específicos de achados radiológicos de menor importância: na trissomia 21, as vértebras lombares e a pélvis apresentam

alterações características. Um dos achados mais diagnósticos da trissomia 8 em mosaico é um conjunto de anomalias esqueléticas que incluem ausência de hipoplasia da patela, múltiplas anomalias vertebrais e asas ilíacas abruptamente ascendentes. A anomalia dup(9p) também é acompanhada de achados radiológicos característicos, que incluem ossificação tardia ou defeituosa dos ossos púbicos, atraso importante no amadurecimento ósseo, múltiplas pseudoepífises de metacarpos e falanges, epífises grossas nas falanges distais dos primeiros raios e falanges médias displásicas nos quintos raios. A síndrome del(1)(q21→q25) possivelmente esteja relacionada com achados radiológicos específicos nas mãos e nos pés.

### Crescimento

O crescimento tende a ser reduzido em pacientes com aberrações cromossômicas autossômicas. Para muitas das aberrações mais bem conhecidas há um espectro específico de retardo de crescimento intrauterino e pós-natal. O histórico genético aparentemente também contribui para o grau de retardo do crescimento nas aberrações cromossômicas autossômicas. A estatura extremamente baixa, como é encontrada em muitas síndromes de displasia óssea, não é característica de aberrações cromossômicas. Se o nanismo

extremo é encontrado em um paciente com uma aberração para a qual é infrequente, uma deficiência de hormônio do crescimento deve ser considerada. A deficiência desse hormônio provavelmente seja mais frequente nas aberrações cromossômicas autossômicas, mas é muitas vezes não diagnosticada, pois esses pacientes já tendem a ter, de qualquer forma, baixa estatura. A deficiência de hormônio do crescimento já foi comprovada, entre outros, em casos de trip(22)(pter→q11) (síndrome de olho de gato) e del(18p).

A idade óssea é atrasada em muitas síndromes, como na del(4)(pter→p16.3 para p15) e dup(9p). Nesses pacientes, e em muitos casos de aberrações autossômicas, a puberdade é retardada e encurtada, e o crescimento pode continuar até a idade de 22 ou mesmo 25 anos. Logo, nossas curvas de crescimento padrão e as tabelas de previsão de altura final não podem ser aplicadas corretamente a pacientes com aberrações cromossômicas. Há curvas de crescimento específicas para 45,X e trissomia 21.

## Puberdade e fertilidade

Da mesma forma que a hipoplasia genital, a puberdade retardada e encurtada é um achado bastante constante em muitas aberrações cromossômicas autossômicas. Os casos de homens férteis são muito incomuns, tendo sido encontrados apenas casos individuais de alguns sujeitos com cromossomos autossômicos em anel e casos ocasionais de trissomia 8, trissomia 21 e trip(22)(pter→q11) (síndrome de olho de gato). A razão disso possivelmente esteja não apenas na hipoplasia gonadal e na disfunção, mas também na inteligência reduzida e no comportamento não agressivo. Os resultados de exames histológicos testiculares, meioses e espermogramas em pacientes com síndrome de Down não excluem a fertilidade.

Em mulheres com aberrações autossômicas, a puberdade normal e a fertilidade são mais comuns do que entre homens. A disgênese gonadal é uma característica de algumas aberrações, incluindo as trissomias 13 e 18, e a hipoplasia ovariana também ocasionalmente é encontrada. Em geral, sabemos pouco sobre a histologia e a função ovarianas em pacientes

com aberrações cromossômicas autossômicas, principalmente porque muitas são descritas quando ainda crianças, mas também porque raramente se obtêm biópsias. Há relatos de gravidez em pacientes com trissomia 21, vários cromossomos em anel, del(18p), del(18)(q21→qter), trissomia 8 em mosaico, trip(22)(pter→q11) e duplicações, além de mais raramente, deleções de vários segmentos autossômicos menores.

## Complexos de malformações, associações e síndromes relacionadas a aberrações cromossômicas autossômicas

Um complexo ou uma sequência de malformações é definida como múltiplos defeitos estruturais causados por um defeito localizado durante o início da embriogênese. Alguns exemplos são a holoprosencefalia (anomalias cerebrais e faciais devidas a hipoplasia presumida da notocorda) e o complexo de malformação de ameixa seca (bexiga grande, agenesia dos músculos abdominais, criptorquidia e hidronefrose após obstrução da uretra fetal). Se um recém-nascido tem um conjunto de malformações com nenhuma outra anomalia adicional, isso ocorre devido a um evento esporádico e não a uma aberração cromossômica, nem a um único gene mutante. Se outras anormalidades e malformações não explicadas pelo defeito localizado específico são encontradas, uma aberração cromossômica mais provavelmente seja a causa subjacente. Entretanto, em casos raros, um complexo de malformações pode ser o único achado em uma aberração cromossômica que seja óbvia ao nascimento. Logo, um exame cromossômico deve ser realizado em crianças que tenham um conjunto de malformações fatais, nas quais o acompanhamento não é possível. Exemplos de tais situações são os casos de complexo de malformações de DiGeorge ou holoprosencefalia.

Os seguintes conjuntos de malformação estão associados com as seguintes aberrações cromossômicas: holoprosencefalia (HPE) com trissomia 13, triploidia, del(18p), del(13q), inclusive (13)(q21→qter), deleções de 7q36

(pelo menos quatro dos segmentos contêm genes para HPE); complexo de malformações DiGeorge com  $\text{del}(22\text{q}11.2)$  e  $\text{del}(10)(\text{pter} \rightarrow \text{p}13)$ ; complexo de malformações de abdome de ameixa seca com trissomias 13 e 18; complexo de malformações Robin com  $\text{del}(4)(\text{q}31 \rightarrow \text{qter})$ ; complexo de malformações facio-aurículo-vertebral com  $\text{trip}(22)(\text{pter} \rightarrow \text{q}11)$ .

Uma associação é definida como uma combinação não aleatória de dois ou mais defeitos estruturais que não são devidos a um único distúrbio localizado de embriogênese. Alguns exemplos são as associações VATER e VACTERK (anomalias vertebrais, atresia anal, fistula TE, defeitos cardíacos, anomalias renais e dos membros) e a associação entre aniridia e tumor de Wilms. Ambas podem ser devidas a aberrações cromossômicas. A associação entre aniridia e tumor de Wilms é encontrada em pacientes com  $\text{del}(11\text{p}13)$ ; esse segmento contém tanto o gene da aniridia como um dos genes do tumor de Wilms (WT1). Esses casos frequentemente apresentam genitália masculina ambígua e outras anomalias de maior ou menor importância, inclusive retardo mental. Outros casos com essa associação e cromossomos normais geralmente não apresentam esses achados extras. A associação VATER pode ser encontrada em várias aberrações autossômicas, inclusive na trissomia 18,  $\text{del}(13)(\text{q}21 \rightarrow \text{qter})$  e  $\text{trip}(22)(\text{pter} \rightarrow \text{q}11)$ . Uma aberração cromossômica deve ser suspeitada em qualquer caso de associação do tipo VATER em que o paciente também apresente outras anomalias e/ou retardo somático ou mental.

Uma síndrome é definida como uma combinação de dismorfismos e/ou malformações que presumivelmente sejam devidas à mesma etiologia conhecida, mas não possam ser explicadas por um único defeito localizado na embriogênese. A maioria das síndromes é resultado de genes mutantes ou de aberração cromossômica. Um dos exemplos de síndromes com etiologia ainda desconhecida é a síndrome de Cornelia De Lange. Descobriu-se que casos do tipo De Lange, por exemplo, tinham  $\text{dup}(3)(\text{q}21 \rightarrow \text{qter})$  ou  $\text{dup}(13)(\text{q}21 \rightarrow \text{qter})$ . Um estudo com uma série maior de pacientes típicos com a síndrome de Lange, por outro lado, não encontrou nenhum caso com cariótipo anormal.<sup>1</sup>

## Aberrações cromossômicas e tumores

Não há atualmente como responder a questões como se os portadores de aberrações cromossômicas, como um grupo, têm mais chances de ter tumores. A leucemia na infância precoce é mais frequente na síndrome de Down do que na população em geral. Uma associação entre a trissomia 8 e vários tumores foi sugerida, já que a trissomia 8 é um achado bastante frequente nas células de medula óssea de pacientes com leucemia; entretanto, essa associação não foi estabelecida de forma definitiva até agora. O mosaicismismo com uma linhagem de células 46,XY contendo um Y estruturalmente anormal e outra linhagem de células 45,X geralmente é associado com o gonadoblastoma, que com frequência ocorre na puberdade ou após esse período.

Outra questão é a perda de um alelo do gene protetor contra tumores através da deleção cromossômica. Se isso ocorre, a probabilidade de que outro alelo tenha passado por mutação ou sido perdido em pelo menos uma célula do órgão em que o tumor ocorreria é alta. Alguns exemplos são o retinoblastoma, em casos de  $\text{del}(13\text{q}14)$  (gene Rb1), e o tumor de Wilms, em  $\text{del}(11\text{p}13)$  (gene WT1).

## Aberrações cromossômicas em gêmeos monozigóticos

Os gêmeos monozigóticos oferecem a chance de estudarmos a influência de fatores ambientais intrauterinos na ocorrência de traços dismórficos, malformações e retardo de crescimento nas aberrações autossômicas. Uma comparação de relatos de casos de várias aberrações em gêmeos monozigóticos concordantes mostra o seguinte: gêmeos monozigóticos geralmente são discordantes para crescimento pré-natal; eles são muito semelhantes quanto aos seus dismorfismos; o achado mais surpreendente é a alta taxa de discordância para malformações congênitas (exceto aquelas causadas por haploinsuficiência); o crescimento e o desenvolvimento pós-natal são bastante discordantes, se as diferenças devidas a cérebros discordantes e outras malformações

forem levadas em consideração. A implicação dessas observações é que o crescimento pré-natal na presença de uma aberração cromossômica é amplamente influenciado pelo suprimento de sangue placentário, e apesar das aberrações cromossômicas autossômicas predispor o feto a certas malformações específicas, sua expressão é, em última análise, devida a diferenças sutis do desenvolvimento intrauterino (suprimento de sangue placentário, entre outros).

## Desenvolvimento motor e mental e comportamento

O grau de dano mental é característico de cada aberração cromossômica: o desenvolvimento mental varia entre certos limites que são influenciados por aberração específica, fatores genéticos (familiares), influências adversas intrauterinas e perinatais e de acordo com malformações e deficiências específicas, tais como malformações cerebrais, surdez, cegueira, dano motor e outros. Uns poucos exemplos disso incluem a grande proporção de pacientes com trissomia 8 em mosaico, que têm retardo mental de leve a moderado, uma minoria tem inteligência mediana ou tem retardo grave, sendo que os últimos frequentemente apresentam agenesia do corpo caloso. Há raros exemplos de  $\text{del}(18p)$  com desenvolvimento mental normal; entretanto, a maioria funciona dentro de um espectro de retardo mental moderado, com QI próximo a 50; uma minoria, que inclui todos os pacientes com holoprosencefalia, tem retardo mental de grave a profundo. O dano mental na síndrome de Down geralmente é de moderado a grave, e raramente apenas leve ou profundo. A síndrome de  $\text{del}(4)(p_{15})$  (Wolf) está invariavelmente associada com retardo mental de grave a profundo.

Apesar de a deficiência mental grave ser característica da maioria das aberrações cromossômicas individuais, umas poucas aberrações são compatíveis com inteligência normal em alguns propósitos. Uma minoria dos pacientes com a síndrome de olho de gato [ $\text{trip}(22)(p_{11})$ ],  $\text{dup}(18p)$ ,  $\text{del}(18p)$  e trissomia 8 em mosaico se encaixa nessa categoria. Além disso, há relatos de casos individuais de duplicação de segmentos intersticiais, tais como

$\text{dup}(13)(q_{21} \rightarrow q_{22})$  e  $\text{dup}(3)(q_{22} \rightarrow q_{24})$ , que mostram inteligência normal e pouco ou nenhum estigma físico. Esses casos são detectados durante investigações da família quando outros membros com graves deficiências apresentam deleção do mesmo segmento devido a uma translocação insercional familiar. Como não foram relatados outros casos, não se sabe se, nos casos do tipo descrito anteriormente, o desenvolvimento intelectual é sempre, geralmente, frequentemente ou ocasionalmente normal.

Em relação a funções motoras e mentais específicas, observa-se, em geral, que a linguagem é desproporcionalmente anormal em pacientes com aberrações autossômicas.<sup>2,3</sup> As habilidades motoras e a adaptação social são, em geral, relativamente boas, mas as funções intelectuais exigidas para combinações e matemática costumam ser bastante pobres.

Pouco se sabe sobre as características comportamentais específicas dos pacientes com aberrações autossômicas. A maioria dos casos com aberrações mais bem conhecidas não apresenta problemas psicológicos graves que não possam ser explicados por seu ambiente. Parece haver, entretanto, algumas exceções. A aberração mais bem conhecida que se apresenta associada a um comportamento determinado é a síndrome de Smith-Magenis [ $\text{del}(17p_{11.2})$ ]. Especificamente, os traços característicos são tristeza e frustração, mudanças repentinas de humor, acessos de gritos, hiperatividade, dificuldade de concentração, irritabilidade, comportamento impulsivo e agressivo com acessos de birra, atos violentos, comportamentos de coçar, morder e puxar os cabelos, comportamentos autodestrutivos e automutilações. Outro exemplo é a síndrome  $\text{trip}(15)(p_{11})$ . Muitos dos pacientes com esse cromossomo dicêntrico extra são ansiosos, hiperativos, autoagressivos e apresentam tremores, uma baixa tolerância à frustração e traços autísticos, podendo até mesmo apresentar comportamento psicótico e sofrer distúrbios convulsivos. O retardo mental é de grau moderado a profundo. Muitos pacientes com cromossomos autossômicos em anel que têm poucas anomalias físicas e retardo mental de leve a moderado apresentam características semelhantes, inclusive a agressividade. Isso é particularmente verdadeiro para pacientes com o cromossomo  $r(20)$ , que, além

disso, frequentemente desenvolvem epilepsia lobotemporal. O comportamento agressivo e sinais de esquizofrenia são repetidamente relatados em pacientes com cromossomos r(18).<sup>4,5</sup> Também foi relatada esquizofrenia em uma menina de inteligência normal que tinha trissomia 8 em mosaico.<sup>6</sup>

## Correlações entre cariótipo e fenótipo

O mosaicismo para um cromossomo adicional ou perdido resulta em uma expressão clínica reduzida para uma trissomia, duplicação ou deleção. Em geral, o grau de deficiência física e mental está correlacionado com a percentagem de metáfases aberrantes; essas, entretanto, podem variar consideravelmente entre os diferentes tecidos.

Para a duplicação de segmentos autossômicos, o grau de retardo de crescimento e mental e a incidência de malformações em geral estão positivamente correlacionados com o tamanho do segmento duplicado até um tamanho que é incompatível com a vida, exceto para as poucas trissomias autossômicas.

A duplicação de um segmento autossômico específico leva a uma alteração fenotípica e deficiências menos graves do que a deleção do mesmo segmento. Para muitos, e especialmente os segmentos maiores, apenas a duplicação é conhecida, provavelmente porque a deleção não permite a sobrevivência intrauterina.

Algumas características fenotípicas podem ser mapeadas em relação a segmentos autossômicos específicos. A hexadactilia pós-axial é um achado frequente na trissomia 13; se casos de duplicação de vários segmentos do cromossomo 13 forem estudados, a hexadactilia pós-axial só será encontrada nas duplicações dos segmentos que incluem (13)(q31qter). Nesses casos, ocorre tão frequentemente quanto na trissomia 13 total. Pode-se, dessa forma, concluir que a duplicação de (13)(q31qter) é responsável pela hexadactilia pós-axial na trissomia 13 total. Uma correlação semelhante é vista na ausência de corpo caloso na trissomia 8 em mosaico e na dup(8p). O mapeamento das malformações no sentido de que uma malformação em particular ocorre apenas, e sempre, em aneuploidia de um segmento cro-

mossômico específico se mostrou até agora impossível. Algumas características chegam muito próximo dessa exclusividade. A aniridia, por exemplo, foi encontrada em todos os pacientes com del(11p13) nos quais o gene da aniridia é incluído na deleção; entretanto, foi ocasionalmente observada na trissomia 13 e em outras aberrações autossômicas. O retinoblastoma é muito frequente em del(13q14) com a perda de um alelo do gene Rb1, mas provavelmente também seja mais frequente do que esperado na síndrome de Down.

A triplicação (tetrassomia parcial) na forma de um cromossomo extra foi encontrada em humanos apenas em alguns segmentos autossômicos, incluindo 5p em mosaico, 8p, 9p, 12p, 18p, (15)(pter→q13), (21)(pter→q22.1) e (22)(pter→q11). A triplicação geralmente surge de forma adquirida como um evento esporádico, sendo, dessa forma, mais difícil de demonstrar do que a duplicação. As triplicações intersticiais parecem não ser tão raras quanto anteriormente se supunha, mas podem ser demonstradas apenas com métodos citogenéticos moleculares, particularmente a FISH. As características clínicas de trip(9p) são bastante semelhantes às aquelas encontradas em dup(9p), mas a incidência de malformações provavelmente seja mais alta na triplicação. As triplicações de segmentos de 15, 18 e 22 mencionadas anteriormente também parecem levar a achados clínicos mais graves e distintos do que a duplicação do segmento correspondente.

A recente detecção de rearranjos subteloméricos submicroscópicos (na maioria microdeleções) pela aplicação de análise de marcadores microssatélites ou FISH,<sup>7</sup> MLPA<sup>8</sup> ou aCGH<sup>9</sup> ajudou a definir algumas aberrações cromossômicas que são difíceis ou impossíveis de determinar nos cariótipos usando técnicas de banda, como, por exemplo, as deleções distais 1p e 22q, a deleção intersticial 17q21.31 e translocações recíprocas sutis. Além disso, mostrou-se que algumas microdeleções e duplicações subteloméricas e intersticiais apresentam retardo mental com ou sem anormalidades físicas adicionais. Essa observação está em paralelo com os achados em pacientes com cromossomos autossômicos em anel com pontos de quebra muito terminais. Por outro lado, alguns pacientes com rearranjos submicroscópicos apresentam apenas característi-

cas autistas, como atraso do desenvolvimento, apenas padrões dismórficos (mesmo muito leves) com ou sem retardo mental e, algumas vezes, um dos pais com achados limitrofes ou mesmo sem nenhum achado anormal, apesar

de o rearranjo ser o mesmo, o que indica que algumas aberrações não causam consistentemente um fenótipo anormal. Estamos somente no início da detecção de um grande número de tais aberrações.

## Referências

1. Beck B, Mikkelsen M. Chromosomes in the Cornelia de Lange syndrome. *Hum Genet.* 1981;59(4):271-6.
2. Debray-Ritzen P, Bursztejn C, Vivier R, Rethoré MO, Prieur M, Lejeune J. Troubles graves d'intégration du langage de l'enfant et aberration chromosomique à propos de trois cas. *Rev Neurol.* 1974 130:357-65.
3. Mutton DE, Lea J. Chromosome studies of children with specific speech and language delay. *Dev Med Child Neurol.* 1980 Oct;22(5):588-94.
4. Krag-Olsen B, Brask B, Jacobsen P, Nielsen J. Is there an increased risk of psychoses in patients with ring 18 and deletion long arm 18? In: Schmid W, Nielsen J, editors. *Human behavior and genetics.* Amsterdam: Elsevier; 1981.p. 211-20.
5. Schinzel A. Particular behavioral symptomatology in patients with rarer autosomal chromosome aberrations. In: Schmid W, Nielsen J, editors. *Human behavior and genetics.* Amsterdam: Elsevier; 1981.p.195-210.
6. Sperber MA. Schizophrenia and organic brain syndrome with trisomy 8 (group-C trisomy 8, 47,XX,+8). *Biol Psychiatry.* 1975 Feb;10(1):27-43.
7. Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet.* 1995 Feb;9(2):132-40.
8. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat.* 2004 Jan;23(1):17-21.
9. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.

## Leituras recomendadas

Savoldelli G, Schmid W, Schinzel A. Prenatal diagnosis of cleft lip and palate by ultrasound. *Prenat Diagn.* 1982 Oct;2(4):313-7.

Schinzel A. Karyotype-phenotype correlations in autosomal chromosome aberrations. In: Epstein C, editor. *The phenotypic mapping of Down syndrome and other aneuploid conditions.* Wiley-Liss; 1993.p. 19-31. (Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 384).



# Índice

## A

- Aberração cromossômica
  - autossômica (paciente)
    - aberrações cromossômicas e tumores, 322
    - achados clínicos, 317-325
      - história familiar e gravidez, 317
    - anomalias esqueléticas radiológicas, 320
    - cariótipo e fenótipo (correlações), 324-325
    - complexos de malformações, associações e síndromes, 321-322
    - crescimento, 320-321
    - desenvolvimento motor e mental e comportamento, 323-324
    - gêmeos monozigóticos, 322-323
    - malformações congênitas, 319-320
    - padrão de achados dismórficos, 318-319
    - puberdade e fertilidade, 321
  - dano do DNA, 169-175
  - estrutural, 80-102
    - alterações balanceadas, 85-94
      - inserção, 90
      - inversão, 85-87
      - translocação com origem definida e destino aleatório, 94
      - translocação de braço inteiro, 92-93
      - translocação recíproca, 87-90
      - translocação robertsoniana, 90-92
    - alterações não balanceadas, 80-85
      - anel cromossômico, 85
      - deleção, 80-81
      - duplicação, 82-83
      - isocromossomo, 83-84
      - isodicêntrico, 84
    - outras alterações e nomenclaturas, 95-102
      - cromossomo derivado, 96-97
      - cromossomo dicêntrico, 97
      - cromossomo marcador, 96
      - material adicional de origem desconhecida, 95
      - neocentrômeros, 99-102
      - regiões homogeneamente coradas, 97-99
      - tumores, 322
- Abortamentos de repetição, 286-293
- Aconselhamento genético
  - diagnóstico pré-natal, 280-281
  - síndrome de microdeleção, 262
- Alteração cromossômica
  - numérica, 70-79
  - formação (origem, causas e mecanismos), 162-168
    - alterações numéricas, 162-163
      - aneuploidias, 162-163
      - euploidias, 162
      - idade materna, 163
    - causas toxicogenômicas, nutrigenômicas e farmacogenômicas, 166-167
    - ciclo celular (controle de checagem), 166
    - infertilidade masculina, 166
    - mecanismos da não disjunção, 163-164
      - alterações do fuso mitótico, 164
      - efeito intercromossômico, 164
      - orientação merotética do cinetócoro, 164
    - recombinação, 164
    - mecanismos de formação das alterações estruturais, 164-166
- Alterações do Y (cromossomos sexuais), 116-117
- Alterações estruturais, mecanismos de formação das, 164-166
- Anáfase
  - I, II, 36-37
  - mitose, 29-30
- Análise citogenética (cultura de tecidos), 54-62
- Anel cromossômico (aberrações cromossômicas estruturais), 85

- Anel do cromossomo  
 X, 123-124  
 Y (alterações cromossomos sexuais), 116  
 Anemia de Fanconi, 151-161  
 Aneuploidias, 72-74  
   formação das alterações cromossômicas, 162-163  
 Anomalia citogenética  
   diagnóstico pré-natal, 280-285  
   aconselhamento genético, 280-281  
   cromossomopatias fetais (detecção), 283-285  
   cariótipo fetal, 283  
 hibridização genômica comparativa (CGH), 284-285  
 hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), 283-284  
   esqueletais radiológicas, 320  
   procedimentos invasivos, 282-283  
   reação em cadeia da polimerase (PCR), 284-285  
   translucência nugal, 281-282  
 Anormalidades (leucemia linfocítica crônica)  
   de 11q, 237, 239-240  
   de 13q, 236-237, 239  
   de 17p, 237, 240  
 Apoptose, 49-52  
   ensaio cometa, 195-196  
 Associação WAGR, 261  
 Aurora-quinases, 48-49
- B**
- Bandeamento  
   e coloração cromossômica (técnicas), 63-69  
   bandas ao longo de todo o cromossomo, 63-65  
   hibridização *in situ* por fluorescência, 68-69  
   regiões específicas do cromossomo, 65-68  
   multicores, 269  
 Biópsia  
   de pele (pulmão e ovário), 61-62  
   de vilosidades coriônicas, 60-61  
 Blastômeros (técnica de retirada), 297-302  
 Bloqueio da citocinese celular, 180-193  
 BUDs nucleares  
   critérios para análise, 190  
   micronúcleos, técnica de, 184
- C**
- Calibração (ensaio cometa), 199-200  
 Câncer e instabilidade cromossômica, 253  
 Cariotipagem espectral ou multiplex FISH, 268
- Cariótipo  
 45,X/46,XY e variantes, 113  
 46,XX/46,XY, 113  
 e fenótipo, correlação entre, 324-325
- Células  
 apoptóticas (critérios para análise), 190  
 binucleadas  
   critérios para análise, 188  
   micronúcleos, técnica de, 182  
 coletas (análise citogenética), 56  
 do trofoectoderma (técnica de retirada), 297-302  
 necróticas (critérios para análise), 190
- Células-alvo e substitutas (ensaio cometa), 196
- Centrômero, 19-20
- Ciclo celular, 24-42  
 controle, 43-53  
   apoptose, 49-52  
   de checagem, 166  
   proteínas e enzimas, 44-49  
     aurora-quinases, 48-49  
     fator promotor de maturação, 46  
     polo-quinases, 46-48  
     proteína-quinases dependentes de ciclina, 45-46
- interfase, 26-28
- meiose, 34-40  
 erros da meiose, 38-40  
   divisão transversal centrométrica, 39-40  
   idade parental, 40  
   não disjunção autossômica, 38-39  
   não disjunção dos cromossomos sexuais, 39  
 gametogênese, 37-38  
 ovogênese, 38  
 meiose I, 35-37  
   anáfase I, 36-37  
   metáfase, 36  
   prófase I, 35-36  
   telófase I, 37  
 meiose II  
   metáfase, 37  
   prófase II, 37  
   telófase II, 37
- mitose, 28-33  
 anáfase, 29-30  
 citocinese, 31  
 cromátides-irmãs, segregação das (anormalidades), 33  
 cromatina (fragmentos retardatários), 33  
 cromossomos retardatários, 33  
 endomitose, 32  
 endorreduplicação, 31

- erros da mitose, 31-32
- metáfase, 29-30
- mitose bipolar assimétrica, 32
- mitose C, 32
- mitose multipolar, 32
- polaridade e simetria do fuso (anormalidades), 32
- politenia, 32
- ponte nucleoplasmática, 33
- prófase, 29
- telófase, 30-31
- Cinetócoro, orientação merotética do, 164
- Cinogenética clássica (tumores sólidos), 253-255
- Citocinese, 31
- Citogenética
  - clínica (história), 11-16
  - molecular, 255-257, 264-272
    - desenvolvimento das técnicas, 264
    - nomenclatura cromossômica em FISH, 267
    - princípio da técnica, 264-267
    - técnica de FISH (aplicações), 270-272
    - variantes da técnica de FISH, 267-270
- Citotoxicidade (índice de divisão nuclear), 190
- Cometas, avaliação dos, 198-199
- Corpúsculos polares (técnica de retirada), 297-302
- Crescimento (aberração cromossômica autossômica), 320-321
- Cromátides-irmãs, troca entre, 176-179
- Cromatina (organização molecular), 17-23
- Cromossomo
  - 1, 9, 16 e Y (heterocromatina), 21-22
  - aberrações (dano do DNA), 169-175
  - aberrações cromossômicas estruturais, 95-102
    - classificação, 70-74
    - aneuploidias, 72-74
    - euploidias, 71
    - monossomias, 74
    - tetraploidia, 72
    - tetrassomias e pentassomias, 74
    - triploidia, 71-72
    - trissomias, 74
  - alteração cromossômica, 70-79
    - trissomia do cromossomo 21, 76-78
    - trissomia do cromossomo 8, 78
    - trissomia do cromossomo 9, 78
    - trissomia do cromossomo 13, 77
    - trissomia do cromossomo 16, 78
    - trissomia do cromossomo 18, 77
    - trissomias de cromossomos autossômicos, 74-75
  - derivado, 96-97
  - dicêntrico, 97
  - formação das alterações cromossômicas, 162-168
  - humano e cromatina
    - estrutura e organização, 17-23
      - características variáveis normais dos cromossomos, 21-22
      - centrômero, 19-20
      - constrições secundárias, 20
      - DNA, condensação do, 17-19
      - DNA, estrutura básica do, 17
      - telômeros, 20-21
      - telomerase, 21
  - marcador, 96
  - retardatário, 33
  - satélites e hastes dos satélites, 22
  - sexual, não disjunção do, 39
  - sexual (alterações), 103-118
    - 45,X/46,XY e variantes, 113
    - alterações do Y, 116-117
      - anel do cromossomo Y, 116
      - deleção de Yp, 116
      - deleção de Yq, 116
      - isocromossomo do Y, 116-117
      - translocações com o cromossomo Y, 117
  - cariótipo 46,XX/46,XY, 113
  - estruturais do cromossomo X, 113-115
    - deleção de Xp, 114
    - deleção Xq, 114
    - duplicação de Xp, 114
    - duplicação de Xq, 114
    - inversão do cromossomo X, 114
    - translocações X;autossomo, 114-115
  - fenótipo (genes do cromossomo X relevantes), 115-116
  - mulheres com outras polissomias do cromossomo X, 110
  - síndrome 47,XYY, 108-110
  - síndrome de Klinefelter, 106-108
  - síndrome de Turner, 110-113
- X
  - mecanismo de inativação a alterações, 119-126
    - alterações estruturais, 123-124
      - anel do cromossomo X, 123-124
      - deleção parcial do cromossomo X, 124
      - translocações do cromossomo X com autossomos, 124
    - alterações sob ponto da inativação do cromossomo X (numéricas), 122-123
      - Klinefelter (47,XXY), 122
      - triplo X (47,XXX), 122
      - síndrome de Turner (45,X), 122
      - poliploides, 122-123

- trissomias autossômicas, 123
- evolução, 119-120
- genes que escapam da inativação, 121
- mecanismo de inativação, 120-121
- mosaicismos, 120
- padrão de inativação (identificação), 121-122
- regiões pseudoautossômicas, 121
- Cromossomopatias fetais (detecção), 283-285

## D

- Deficiência mental FRAXE, 149
- Deleção
  - aberrações cromossômicas estruturais, 80-81
  - braço longo do cromossomo 11, do braço curto do 12 e do braço longo do 13, 217
  - 1p36 (síndrome de microdeleção), 261-262
  - 20q, 216
  - 5q isolada, 215
  - de 6q (leucemia linfocítica crônica), 238-239
  - de XP (alterações cromossomos sexuais), 114
  - de Yp (alterações cromossomos sexuais), 116
  - de Yq (alterações cromossomos sexuais), 116
  - do braço curto do 7, 216
  - parcial do cromossomo X, 124
  - Xq (alterações cromossomos sexuais), 114
- Desenvolvimento motor e mental e comportamento, 323-324
- Diabete neonatal transitório, 133-134
- Diagnóstico
  - citogenético
    - leucemia linfocítica aguda, 223-233
    - leucemia linfocítica crônica, 234-241
    - leucemia mieloide aguda, 208-212
    - leucemia mieloide crônica, 203-207
    - linfomas malignos, 242-251
    - síndrome mielodisplásica, 213-218
    - síndromes mieloproliferativas crônicas, 219-222
  - genético pré-implantação, 294-316
    - alterações cromossômicas estruturais, 306
    - corpúsculos polares, blastômeros e células do trofoectoderma (retirada), 297-302
    - ação mecânica, 298
    - ação química, 298
    - blastômeros (biópsia para retirada), 300-301
    - corpúsculos polares (biópsia para retirada), 298-299

- trofoectoderma (biópsia para retirada), 301-302
- gametas e embriões, obtenção de, 294-296
- hibridização genômica comparativa, 307-309
- técnica de *microarray*, 308-309
- métodos de análise genética, 302-306
  - hibridização *in situ* por fluorescência, 303
  - alterações cromossômicas numéricas, 303-305
  - blastômeros por FISH, 305-306
  - reação em cadeia da polimerase, 302-303
- perspectivas e limitações, 311-313
- rastreamento genético pré-implantação ou *screening* genético pré-implantação, 309-310
- técnicas (modificações e dificuldades), 310-311
- pré-natal (anomalias citogenéticas), 280-285
- Dieta (frequência de micronúcleos), 191-192
- Dissomia uniparental e *imprinting*, 127-146
- Divisão
  - nuclear, índice de, 190
  - transversal centrométrica, 39-40
- DNA
  - condensação, 17-19
  - dano
    - técnica de aberrações cromossômicas, 169-175
    - aberrações estruturais (cromossômica ou cromatídicas), 171
    - destinos das células, 174
    - exposições, 171-173
    - linfócitos do sangue periférico, 171
    - origem, 170-171
    - tipos, 173-174
  - estrutura básica, 17
  - mitocondrial, 196
  - reparo de, 196-197
- Double minutes, 98
- Duplicação
  - aberrações cromossômicas estruturais, 82-83
  - de Xp (alterações cromossomos sexuais), 114
  - de Xq (alterações cromossomos sexuais), 114

## E

- Efeito intercromossômico, 164
- Eletroforese (ensaio cometa), 198
- Embriões e gametas, obtenção de, 294-296
- Endomitose, 32
- Endonucleases (lesão específica e estresse oxidativo), 197-198

Endorreduplicação, 31  
 Ensaio cometa, 194-202  
   apoptose, 195-196  
   avaliação dos cometas, 198-199  
   calibração, 199-200  
   células-alvo e substitutas, 196  
   DNA mitocondrial, 196  
   eletroforese, 198  
   endonucleases (lesão específica e estresse oxidativo), 197-198  
   garantia de confiabilidade, 200  
   genotoxicidade, 200  
   infertilidade masculina e reprodução assistida, 200-201  
   interação gene-ambiente, 200  
   linfócitos, 196  
 Enzima (ciclo celular), 44-49  
 Espermatogênese, 37  
 Estresse oxidativo (endonucleases), 197-198  
 Euploidias, 71  
 Euploidias (alterações cromossômicas), 162  
 Exercícios físicos (frequência de micronúcleos), 192

**F**

Fator promotor de maturação (ciclo celular), 46

Fenótipo  
   e cariótipo, correlação entre, 324-325  
   genes do cromossomo X relevantes, 115-116  
   UPD relacionado à região 14q32.2, 135

Fertilidade e puberdade (aberração cromossômica autossômica), 321

Fuso mitótico, alterações do, 164

**G**

Gametas e embriões, obtenção de, 294-296  
 Gametogênese, 37-38  
 Gêmeos monozigóticos (aberrações cromossômicas), 322-323  
 Gene-ambiente (interação), 200  
 Gênero (influência na frequência de micronúcleos), 191  
 Genética molecular (anemia de Fanconi), 159-160  
 Genotoxicidade (ensaio cometa), 200  
 Gravidez (aberração cromossômica autossômica), 317

**H**

Heterocromatina dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, 21-22

Hibridização  
   genômica comparativa, 270  
   microarranjos ou *array*-CGH, 273-279  
     aplicação em genética clínica, 275-276  
     genoma humano (variação do número de cópias), 276-277  
     método de *array*-CGH, 273-275  
   *in situ* por fluorescência, 68-69  
   síndrome mielodisplásica, 217

História familiar (aberração cromossômica autossômica), 317

## I

Idade  
   influência na frequência de micronúcleos, 191  
   materna (alterações cromossômicas) 163

Idade parental, 40

*Imprinting* e dissomia uniparental, 127-146  
   dissomia uniparental, 136-145  
     associadas a fenótipos anormais, 138-139  
     completas, 139-143  
     de um segmento cromossômico e complexas, 143-145  
     mecanismo de formação, 136-138  
   *imprinting* genômico, 127-136  
     diabete neonatal transitório, 133-134  
     fenótipo UPD relacionado à região 14q32.2, 135  
   osteodistrofia hereditária de Albright e pseudo-hipoparatiroidismo tipos 1A e 1B, 134  
   regiões que sofrem *imprinting*, 130  
   reprodução assistida e erros no padrão de *imprinting*, 135-136  
   reprogramação da metilação na linhagem germinativa, 128-129  
   síndrome de Angelman, 130-131  
   síndrome de Prader-Willi, 130  
   síndrome de Silver-Russel, 131-133  
   síndrome de Wiedemann-Beckwith, 133  
   vantagem evolutiva, 129-130

Índice de divisão nuclear (análise), 190

Infertilidade  
   e abortamentos de repetição (alterações citogenéticas), 286-293  
   abortamento  
     investigação citogenética, 288-292  
     anormalidades cromossômicas, 289-291  
     poliformismos e infertilidade, 291-292  
   infertilidade  
     falência ovariana prematura, 288  
     outras aneuploidias sexuais, 288

- primária e secundária (investigações), 292-293
  - relação com cromossomopatias, 286-288
  - síndrome de Klinefelter, 286-287
  - síndrome de Turner, 287-288
  - masculina, 166
  - ensaio cometa, 200-201
  - Inserção (aberrações cromossômicas estruturais), 90
  - Instabilidade cromossômica e câncer, 253
  - Interfase (ciclo celular), 26-28
  - Inversão
    - aberrações cromossômicas estruturais, 85-87
    - do cromossomo X (alterações cromossomos sexuais), 114
  - Isocromossomo
    - do Y (alterações cromossomos sexuais), 116-117
    - isodicêntrico, 84, 83-84
  - Isodicêntrico (aberrações cromossômicas estruturais), 84
- K**
- Klinefelter (47,XXY), 122
- L**
- Leucemia
    - eosinofílica crônica, 222
    - linfocítica aguda
      - diagnóstico citogenético, 223-233
      - anormalidade citogenéticas, 224-227
      - anormalidades (significado clínico e prognóstico), 227-231
    - definição, epidemiologia, 223
    - etiologia, 223-224
    - linfocítica crônica
      - diagnóstico citogenético, 234-241
      - alterações cromossômicas, 236-238
      - anormalidades (significado clínico e prognóstico), 238-241
      - avaliação citogenética, 234-236
      - definição, epidemiologia, 234
    - mieloide aguda
      - diagnóstico citogenético, 208-212
      - diagnóstico, imunofenotipagem, citogenética, 208-211
      - hibridização *in situ* por fluorescência, 205-207
      - técnicas moleculares, 211-212
    - mieloide crônica (diagnóstico citogenético), 203-207
  - Linfócitos
    - ensaio cometa, 196
    - do sangue periférico – dano do DNA, 171
  - Linfoma
    - de células B, 246-248
    - de células natural killer, 249
    - de células T, 248-249
    - de Hodgkin, 249
    - maligno
      - diagnóstico citogenético, 242-251
      - anormalidades (significado clínico e prognóstico), 250-251
      - anormalidades citogenéticas, 244-249
      - definição, epidemiologia, 242-244
      - diagnóstico citogenético-etilogia, 244
  - Líquido amniótico (análise citogenética), 58-59
- M**
- Malformações congênitas, 319-320
  - Medula óssea (análise citogenética), 57
  - Metáfase
    - meiose I, 36
    - meiose II, 37
    - mitose, 29-30
  - Método de array-CGH, 273-275
  - Microarranjos ou array-CGH, 273-279
  - Microdissecção e pintura cromossômica reversa, 268-269
  - Micronúcleos
    - critérios para análise, 189
    - micronúcleos, técnica de, 182-183
    - frequência de (fatores de influência) 191-192
    - técnica
      - bloqueio da citocinese celular, 180-193
      - buds nucleares, 184
      - células binucleadas, 182
      - critérios, 187-190
      - evolução da técnica, 180-181
      - formação de MNs, BUDs e PNP (modelos de ajuste), 184-187
      - frequência de micronúcleos, 191-192
      - metodologias, 181-182
      - micronúcleos, 182-183
      - pontes nucleoplasmáticas, 183-184
  - Mielofibrose primária, 221
  - Mitose, 28-33
    - bipolar assimétrica, 32
    - multipolar, 32
  - Modelo (técnica de micronúcleos)
    - de Gisselsson e colaboradores, 187
    - de Lidberg e colaboradores, 187
    - de Shimizu, 185-186
    - de Tanaka e Shimizu, 186

- Monossomia, 74  
7 e deleção do braço curto do 7, 216
- Mosaicismo, 120  
cromossômico (abortamentos de repetição), 290
- N**
- Não disjunção autossômica, 38-39
- Nulissomia Y, 216
- O**
- Osteodistrofia hereditária de Albright e pseudo-hipoparatiroidismo tipos 1A e 1B, 134
- Ovário e pulmão (biópsia de pele), 61-62
- Ovogênese, 38
- P**
- Paciente (aberração cromossômica autossômica), 317-325
- Pele (biópsia pulmão e ovário), 61-62
- PNPs (critérios para análise), 189
- Policetemia vera, 219-220
- Poliformismos e infertilidade, 291-292
- Poliploides, 122-123
- Politenia, 32
- Polo-quinases, 46-48
- Ponte nucleoplasmática, 33  
micronúcleos, técnica de, 183-184
- PRINS, 270
- Prófase
- I, II, 35-37  
mitose, 29
- Proteína (ciclo celular), 44-49
- Proteína-quinases dependentes de ciclina, 45-46
- Pseudo-hipoparatiroidismo tipos 1A e 1B, 134
- Puberdade e fertilidade (aberração cromossômica autossômica), 321
- Pulmão (biópsia de pele), 61-62
- R**
- Recombinação (alterações cromossômicas), 164
- Reprodução assistida  
ensaio cometa, 200-201  
erros no padrão de imprinting, 135-136
- S**
- Satélites e hastes dos satélites dos cromossomos, 22
- Síndrome  
47,YYY, 108-110  
com instabilidade cromossômica  
anemia de Fanconi, 151-161  
genética molecular, 159-160
- de Angelman, 130-131
- de Angelman, 259
- de Down, 76-78
- de Jacobsen e FRA11B, 149
- de Klinefelter, 106-108, 286-287
- de Langer-Giedion, 261
- de microdeleção cromossômica, 258-263  
aconselhamento genético, 262  
associação WAGR, 261  
deleção 1p36, 261-262  
síndrome de Angelman, 259  
síndrome de Langer-Giedion, 261  
síndrome de Miller-Dieker, 261  
síndrome de Prader-Willi, 258-259  
síndrome de Smith-Magenis, 260  
síndrome de Williams-Beuren, 260-261  
síndrome velo-cardio facial, 259-260
- de Miller-Dieker, 261
- de Prader-Willi, 130, 258-259
- de Silver-Russel, 131-133
- de Smith-Magenis, 260
- de Turner, 110-113  
45,X, 122  
infertilidade, 287-288
- de Wiedemann-Beckwith, 133
- de Williams-Beuren, 260-261
- do X frágil, 149
- mielodisplásica (diagnóstico citogenético), 213-218  
deleção 20q, 216  
deleção 5q isolada, 215  
deleções do braço longo do cromossomo 11, do braço curto do 12 e do braço longo do 13, 217  
hibridização *in situ* por fluorescência, 217  
monossomia 7 e deleção do Braço curto do 7, 216  
nulissomia Y, 216  
síndrome mielodisplásica primária e secundária, 217  
trisomia 8, 216
- mieloproliferativas crônicas  
diagnóstico citogenético, 219-222  
leucemia eosinofílica crônica, 222  
mielofibrose primária, 221  
policetemia vera, 219-220  
trombocitemia essencial, 221  
velo-cardio facial, 259-260
- Sítios frágeis, 147-161  
classificação, 147-148  
dinâmica da replicação, 148-149  
doenças, 149-150  
deficiência mental FRAXE, 149  
síndrome de Jacobsen e FRA11B, 149

síndrome do X frágil, 149  
sítios frágeis comuns e câncer, 149-150

## T

Tabagismo (frequência de micronúcleos), 191

Tecidos, técnicas de cultura de (análise citogenética), 54-62

bases, 54-62

análise ao microscópico, 57

biópsia de pele, 61-62

biópsia de vilosidades coriônicas, 60-61

coleta de células, 56

coloração e bandeamento, 57

líquido amniótico, 58-59

manuseio e sucesso, 55

medula óssea, 57

meio de cultura, 56

preparação das lâminas, 57

tipos, 55-56

Técnica

de cultura de tecidos, 54-62

de FISH (variantes), 267-270

de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular, 180-193

Telófase

I, II, 37

mitose, 30-31

Telômeros, 20-21

Teraploidia, 72

Tetrassomias e pentassomias, 74

Translocação

com o cromossomo Y, 117

com origem definida e destino aleatório, 94

cromossômicas recíprocas, 290

de braço inteiro, 92-93

do cromossomo X com autossomos, 124

recíproca, 87-90

robertsoniana(s), 90-92, 290-291

X;autossomo, 114-115

Translucência nucal (diagnóstico pré-natal), 281-282

Triplo X (47,XXX), 122

Triploidia, 71-72

Trissomia, 74

8, 216

do cromossomo 8, 78

do cromossomo 9, 78

do cromossomo 12 – leucemia linfocítica crônica, 237-238, 239

do cromossomo 13, 77

do cromossomo 16, 78

do cromossomo 18, 77

do cromossomo 76-78

Trissomias de cromossomos autossômicos, 74-75

Trombocitemia essencial, 221

Tumores

e aberrações cromossômicas, 322

sólidos (citogenética), 252-257

citogenética clássica, 253-255

citogenética molecular, 255-257

instabilidade cromossômica e câncer, 253

## V

Vilosidades coriônicas, biópsia de, 60-61